KURA 金沢大学学術情報リポジトリ
Kanazawa University Repository for Academic resources
金沢大学 KANAZAWA UNIVERSITY

Title	新規脳梗塞治療薬の創製を目指したカンナビノイド受容体作動薬の薬理学的研究
Author(s)	村上, 浩司
Citation	
Issue Date	2013-09-26
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/2297/39355
Right	
学位授与機関	金沢大学
学位の種類	博士（薬学）
学位授与年月日	2013年9月26日
学位授与番号	甲第3974号

*KURAに登録されているコンテンツの著作権は，執筆者，出版社（学協会）などが有します。
*KURAに登録されているコンテンツの利用については，著作権法に規定されている私的使用や引用などの範囲内で行ってください。
*著作権法に規定されている私的使用や引用などの範囲を超える利用を行う場合には，著作権者の許諾を得てください。ただし，著作権者から著作権等管理事業者（学術著作権協会，日本著作出版権管理システムなど）に権利委託されているコンテンツの利用手続については，各著作権等管理事業者に確認してください。

http://dspace.lib.kanazawa-u.ac.jp/dspace/

新規脳梗塞治療薬の創製を目指した
カンナビノイド受容体作動薬の
薬理学的研究

村上　浩司

2013 年 7 月

博　士　論　文

新規脳梗塞治療薬の創製を目指した
カンナビノイド受容体作動薬の
薬理学的研究

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻
分子作用学講座

学　籍　番　号　　1023032533
氏　　名　　村上　浩司
主任指導教員名　　米田　幸雄

目次

第 1 章 はじめに 1

1.1. 緒言 1

1.2. 使用薬物 5

1.3. 略語 6

第 2 章 カンナビノイド受容体作動薬 TAK-937 の脳保護効果および治療可能時間の検討 8

2.1. 序文 8

2.2. 方法 10

2.2.1 実験動物および飼育環境 10

2.2.2 薬物投与用カニューレの留置および薬液調製方法 10

2.2.3 p-MCAO モデルの作製 11

2.2.4 循環器パラメータの測定.....12

2.2.5 採血用カニューレの留置および血液ガスパラメータの測定.....13

2.2.6 脳梗塞体積の測定.....14

2.2.7 統計解析.....15

2.3. 結果.....15

2.3.1 TAK-937 による p-MCAO 処置 1 時間後投与における脳梗塞体積縮小効果.....15

2.3.2 脳梗塞病態下における TAK-937 の循環器系パラメータに及ぼす影響.....16

2.3.3 脳梗塞病態下における TAK-937 の血液ガスパラメータに及ぼす影響.....17

2.3.4 TAK-937 の脳梗塞体積縮小効果における治療可能時間.....19

2.3.5 老齢動物における TAK-937 の脳梗塞体積の縮小効果.21

2.4 考察.....22

第 3 章 TAK-937 および組織プラスミノーゲンアクチベーターの併用投与の脳保護効果.....25

3.1. 序文.....25

3.2. 方法.....26

3.2.1 実験動物および飼育環境.....26

3.2.2 薬物投与用カニューレの留置および薬液調製方法 26

3.2.3 光増感血栓性脳虚血モデルの作製.....27

3.2.4 脳梗塞体積の測定.....27

3.2.5 統計解析.....28

3.3. 結果.....28

3.3.1 t-PA による脳梗塞体積縮小効果の用量依存性.....28

3.3.2 t-PA の至適投与タイミングの検討 29

3.3.3 TAK-937 投与による脳梗塞体積縮小効果の用量依存性 31

3.3.4　t-PA と TAK-937 との併用効果：脳梗塞体積縮小効果 32

3.4. 考察 34

第 4 章 炎症性サイトカインに対する TAK-937 の作用 36

4.1. 序文 36

4.2. 方法 37

4.2.1 実験動物および飼育環境 37

4.2.2 薬物投与用カニューレの留置および薬液調製方法 37

4.2.3 栓子法による中大脳動脈閉塞・再灌流モデルの作製 38

4.2.4 直腸温の測定 38

4.2.5 脳梗塞体積の測定.....38

4.2.6 脳組織サンプルの調製.....38

4.2.7 統計解析.....39

4.3. 結果.....40

4.3.1 CB1 受容体拮抗薬 AM251 による TAK-937 の脳保護効果の阻害作用.....40

4.3.2 中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける炎症性サイトカイン産生量の時間依存性.....42

4.3.3 中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける TAK-937 による炎症性サイトカインの産生抑制作用.....43

4.3.4 TAK-937 による炎症性サイトカインの産生抑制作用における CB1 受容体の関与.....46

4.4. 考察.....48

第 5 章 おわりに.....51

第 6 章 結語 52

謝辞 53

引用文献 53

第 1 章 はじめに

1.1. 緒言

脳卒中は、先進国において主な死亡原因であり、また現在増え続ける 60 歳以上の高齢者において Quality of Life (QOL) を著しく損なう主な原因疾患である (Go et al., 2013)。脳卒中は出血性と虚血性に分けられるが、虚血性脳卒中である脳梗塞が全体の約 70〜80%を占める (Warlow et al., 2003)。脳梗塞の主な原因は、血栓性および塞栓性の血管閉塞である (Warlow et al., 1998)。その結果、脳への血流が遮断あるいは低下することにより、その血管が支配する脳組織が障害を受ける。発症早期の脳梗塞では、完全に脳血流が遮断された完全脳虚血部位 (core) と、その周囲に残存血流が認められる虚血周辺部位 (penumbra) と呼ばれる部位が存在することが提唱された (Astrup et al., 1981)。core 領域では血流の途絶により脳細胞の恒常性を維持するだけの十分な血液供給がなく、脳組織は既に細胞死に至っている。一方、penumbra 領域では、著しい血流低下により機能的な障害は認められるが、側副血行路からの残存血流による酸素および栄養補給により未だ組織障害には至っておらず早期の血流回復や適切な処置により、以後の組織障害を防ぎ、機能回復をもたらす余地がある。

脳梗塞の原因が血栓あるいは塞栓による主要血管の閉塞であることから、脳梗塞治療において血栓溶解療法は根本治療としてきわめて重要視される。この血栓溶解療法において主要な役割を果たしているのが、tissue-type plasminogen activator (t-PA) をはじめとする血栓溶解剤である。t-PA は、脳梗塞患者を対象とした臨床試験において有効性が認められており、約 40 か国で承認されている世界的に唯一の脳梗塞急性期治療薬である (Yamaguchi et al., 2006)。日本においても t-PA は虚血性脳血管障害急性期に伴う機能障害の改善の承認を取得し、その使用が推奨されている。一方で t-PA は、脳梗塞発症の時間経過とともに治療効果が低下し、逆に脳内出血や脳浮腫の副作用の危険性が高まることから、その

治療可能時間は発症 3 時間以内と制限されていた (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke t-PA Stroke Study Group, 1995)。近年では、2008 年に欧州で実施された観察試験および介入試験の結果から (Wahlgren et al., 2008, Hacke et al., 2008)、欧州を始め、米国・カナダ、オーストラリアおよび日本において発症から 4.5 時間以内の投与が承認された。しかしながら、t-PA の治療可能時間以降に搬送される脳梗塞患者は依然多く、また治療可能時間内に搬送されたとしても t-PA の適応の可否を判断するための鑑別診断および血液検査に最短でも 1 時間程度を要することから、t-PA の治療可能時間を越えるケースが少なくない。したがって、脳梗塞急性期における治療の充足度は必ずしも高いとはいえないのが現状である。

一方、penumbra 領域における脳梗塞の進展には、グルタミン酸による興奮毒性や炎症性サイトカインの産生などが関与することが報告されている (Dirnagl et al., 1999)。したがって、penumbra 領域は脳梗塞病態の進展、さらには治療対策における重要な関心領域であると考えられる。これまで、この penumbra 領域を標的とした脳保護薬の開発が多数試みられてきた。MK-801 に代表される N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬は、脳梗塞発症後早期に起こるグルタミン酸の過剰遊離による興奮神経毒性の抑制をターゲットとした薬剤である。MK-801 は、前臨床試験において非常に有効であったが (Kamiya et al., 2005)、心・腎毒性により中止された (Davis et al., 2000)。そのほか脳梗塞における神経細胞死のメカニズムから、カルシウムチャネル拮抗薬 (Gelmers et al., 1990, Horn et al., 2001)、ナトリウムチャネル拮抗薬 (Diener et al., 2000)、γ-アミノ酪酸受容体作動薬 (Lyden et al., 2002)、オピオイド受容体拮抗薬 (Clark et al., 2000) といった数多くの脳保護薬の臨床試験が試みられたが、いずれも有効性を示せなかった。その後、免疫抑制剤である FK506 (Maeda et al., 2002)、アストロサイト活性化抑制薬である ONO-2506 (Tateishi et al., 2002)、Rho キナーゼ阻害薬である塩酸ファスジル (Moskowitz et al., 2007, Toshima et al., 2000) の臨床試験も試みられたが、副作用による毒性や有効性が見出せないという理由で開発中止となっている。一方で、フリーラジカル消去剤であるラジカットは、日本において脳梗塞急性期治療薬として承認されたものの、その使用は日本国内にとどまって

いる。また近年、その有効性が期待された一酸化窒素トラップ剤である NXY-059 は、やはり大規模臨床試験においてその有効性が見出せなかった (Shuaib et al., 2007)。したがって現状、世界的に承認された脳保護薬はない。

カンナビノイド (Cannabinoid: CB) 受容体は、大麻草の主要成分である Δ9-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) の受容体として同定された (Gaoini and Mechoulam, 1964)。これまでに CB 受容体は、CB1 受容体 (Matsuda et al., 1990) と CB2 受容体 (Munro et al,. 1993) が同定され、CB1 受容体は主に脳に発現し、CB2 受容体は脾臓および扁桃腺に多く発現していることが知られている (Galiegue et al., 1995、Herkenham et al., 1990)。CB 受容体を活性化した際の生理的作用として、グルタミン酸の遊離抑制や N-および Q-type カルシウムチャネルの阻害、炎症反応や免疫応答の調節などが知られている (Pertwee, 1997、Shen et al., 1996)。これらの作用より CB 受容体作動薬は、脳梗塞後のグルタミン酸による興奮毒性、カルシウムの細胞内への過剰流入、脳内炎症といったような脳梗塞病態の多岐にわたる障害メカニズムに保護的に作用することが期待される (Fig. 1)。

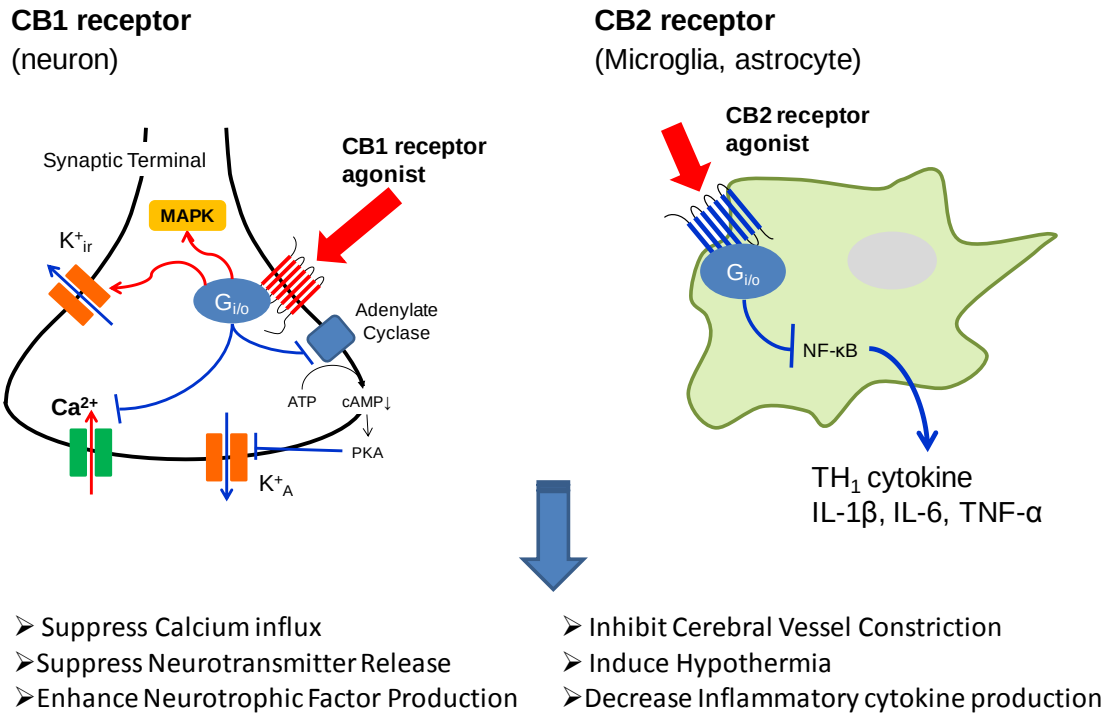
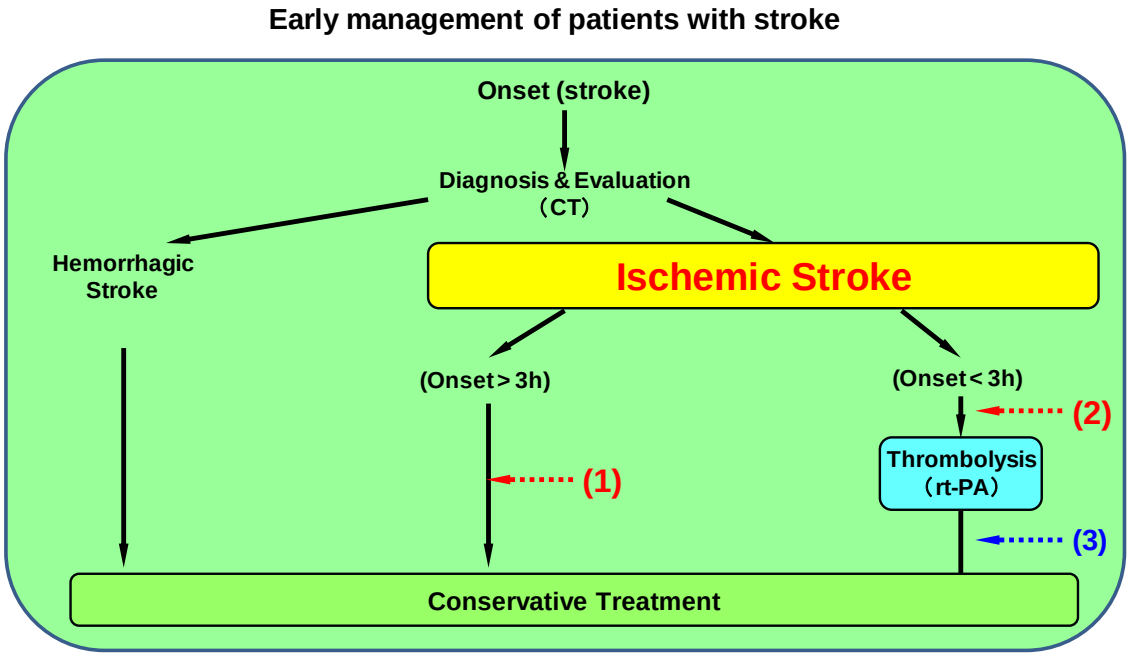


Fig. 1. The physiological roles of CB1/CB2 receptor

実際に CB 受容体と脳梗塞との関連について、CB1 あるいは CB2 受容体ノックアウトマウスでは脳梗塞が増悪するという報告がある (Parmentier et al., 2002, Zhang et al., 2009)。また CB 受容体のリガンド (植物由来リガンド、内因性カンナビノイドおよび合成カンナビノイド) により神経細胞死が抑制されることが報告されている (Nagayama et al., 1999, Grundy et al., 2002)。そこで我々は、CB 受容体作動薬の脳梗塞治療薬としての可能性をさらに検証する目的で、新規構造を有する CB 受容体作動薬の探索を開始して、強い CB1/CB2 受容体結合活性 (ヒトにおける IC_{50}：CB1；6.3 nmol/L、CB2；0.74 nmol/L) および強力な脳保護作用を有する TAK-937 [N-[(3R)-7-[(1R)-1-Hydroxyethyl]-3-(4-isopropylphenyl)-4,6-dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofran-5-yl]-3,3-dimethylbutanamide] を見出した (Suzuki et al., 2012a) 。

上述した前臨床試験において高い有効性を示した脳保護薬が、臨床試験では有効性を示さなかったことを考慮すると、臨床の実態を反映した前臨床試験の条件を設定し、その条件下で脳梗塞急性期治療薬の候補化合物の評価を実施することが重要であると考えられる。すなわち、臨床において新規脳保護薬は、(1) t-PA が適応できず、再開通が達成されなかった脳梗塞患者に適応される場合、(2) t-PA が適応される脳梗塞患者に併用される場合、および (3) t-PA あるいは血行再建療法により血流が再開された脳梗塞患者に適応される場合が想定される (Fig. 2)。また (1) の場合では t-PA の治療可能時間を超えた脳梗塞患者が含まれることから、脳保護薬の治療可能時間は、永久閉塞モデルを用いて検討するべきである。さらに、脳梗塞を発症する患者のうち大多数が高齢者であることから、それを模倣した老齢動物での有効性の検討も重要であると考えられる。



(1); Arteries of these patients are permanently occluded → Efficacy of agents in permanent occluded model

(2); These patients are applied to t-PA → Combination study of agents with t-PA in thrombotic or embolic model

(3); t-PA will accomplished recanalization → Efficacy of agents in ischemic-reperfusion model

Fig. 2. Scheme of early management of acute stroke patients

以上のような観点から、本研究では、より臨床の脳梗塞に則した条件での CB 受容体作動薬の薬効薬理作用を明らかにすることを目的に、ラット中大脳動脈永久閉塞 (p-MCAO) モデルに対する脳保護効果および治療可能時間、老齢ラットを用いた p-MCAO モデルに対する脳保護効果（以上第 2 章）、およびラット中大脳動脈血栓性閉塞モデルを用いた t-PA との併用効果（第 3 章）について検討した。さらに t-PA の再灌流障害を模倣したラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルを用いて、CB 受容体作動薬の脳保護効果およびメカニズム解析の一環として脳内炎症に対する効果（第 4 章）について検討した。

1.2. 使用薬物

TAK-937 [N-[(3R)-7-[(1R)-1-Hydroxyethyl]- 3-(4-isopropylphenyl)-4,6-dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofran-5-yl]-3,3-dimethylbutanamide]は、武田薬品工業株式会社

(大阪) にて合成されたものを使用した。2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD) は、Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) より購入した。t-PA は、協和発酵キリン株式会社 (東京) より購入した。ヘパリンは、味の素製薬株式会社 (東京) より購入した。ヘパフラッシュ (100 単位) は、テルモ株式会社 (東京) より購入した。生理食塩水および注射用生理食塩水は、大塚製薬株式会社 (東京) より購入した。2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)、0.5% メチルセルロースおよびローズベンガルは、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。ペントバルビタールは、大日本住友製薬株式会社 (東京) より購入した。フローセン (ハロセン) は、武田薬品工業株式会社より購入した。Tumour necrosis factor-α (TNF-α)、Interleukin-1β (IL-1β)および Interleukin-6 (IL-6) の ELISA kit は、R&D systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。AM251 は、TOCRIS (Bristol, UK) より購入した。Sprague Dawley (SD) 系ラットは、日本クレア (東京) より購入した。F344 系ラットは、日本エスエルシー (静岡) より購入した。その他の試薬は、和光純薬特級試薬を用いた。

1.3. 略語

BT:	body temperature
CB:	cannabinoid
HPBCD:	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin
HR:	heart rate
IL-1β:	Interleukin-1β
IL-6:	Interleukin-6
MABP:	mean arterial blood pressure
MCA:	middle cerebral artery
MCAO:	middle cerebral artery occlusion
NMDA:	N-methyl-D-aspartate

$PaCO_2$:	partial arterial carbon dioxide
PaO_2:	partial arterial oxygen
PIT:	Photochemically induced Thrombosis
p-MCAO:	permanent middle cerebral artery occlusion
QOL:	Quality of life
SEM:	Standard error of the mean
sO_2:	oxygen saturation
SD:	Sprague Dawley
t-PA:	tissue-type plasminogen activator
TNF-α:	Tumor necrosis factor-α
TTC:	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

第 2 章 カンナビノイド受容体作動薬 TAK-937 の脳保護効果および治療可能時間の検討

2.1. 序文

脳梗塞急性期において t-PA の治療可能時間が 3 時間から 4.5 時間に延長されたとはいえ、以前処置される患者は限定されている。このことから、脳梗塞急性期治療薬を目指した新規脳保護薬は、主に閉塞血管の再開通が達成されない患者に使用されることが想定される。また t-PA の治療可能時間以降に搬送された患者に対して、新規脳保護薬が適応可能であるかどうかを検討しておく必要がある。すなわち前臨床試験において、新規脳保護薬が脳血管永久閉塞モデルでの薬効を示すこと、および同モデルにおける治療可能時間を検討しておくことが脳梗塞急性期治療薬を創製するにあたって肝要である。また健常人では脳血流の自動調節能により脳血流量が血圧によらず一定に保たれているが、脳梗塞患者では脳血流の自動調節能が破綻していることが明らかとなっている。このため、脳梗塞急性期の治療において血圧低下が惹起されると、脳血流量が低下して脳障害の増悪を招く。また、血液ガスパラメータに影響を及ぼす場合、アシドーシスや低酸素状態の誘発、それに続く脳梗塞の増悪が引き起こされる。これより本化合物が脳梗塞病態下において心循環器系および呼吸器系に影響を及ぼすかどうかを検討することは、CB 受容体作動薬の安全性を確認する上で重要である。

脳梗塞は高齢者に発症率が高く、予後機能の改善と年齢が負の相関を示すことが報告されている (Denti et al., 2010)。しかしながら、これまで開発されてきた脳保護薬は、前臨床試験においてほとんど若齢動物を用いた検討しかされておらず、それゆえにこれらの試験が脳梗塞の臨床実態を十分反映しているとは言い難い。実際に、臨床試験において有効性が見出されなかった (RS)-α-amino-3-hydroxy- 5-methyl-4-isoxazole propionic acid 受容体拮抗薬である 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (f)quinoxaline、および NMDA 受容体拮抗薬

である MK-801 は、若齢動物を用いた中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) モデルでは薬効を示すものの、老齢動物では薬効を示さない (Suzuki et al., 2003)。以上から、臨床における有効性を推測する上で老齢動物を用いた検討は適切かつ必要不可欠であると考えられる。

本検討に用いた p-MCAO モデルは、Photochemically induced thrombosis (PIT) モデルをもとに作製した。PIT モデルは、ローズベンガルと緑色光を用いて一重項酸素を産生させ (Saniabadi et al., 1995)、中大脳動脈 (MCA) に血小板主体の血栓を形成させることにより脳虚血を誘発させるモデルである。本モデルは、局所に血栓を形成させることができ、また血栓形成を視認下で確認できることから安定した病態モデルを作製することができる。しかしながら、本モデルは血栓性に血管を閉塞することから自然再開通する可能性があり、p-MCAO モデルにおける薬効評価としては自然再開通しないように改良する必要がある。一般に p-MCAO モデルとして、Tamura モデル (Tamura et al., 1981a, b) と呼ばれる目的血管を電気的に焼灼するモデルが薬効評価に汎用されているが、本試験に使用した SD 系ラットでは血管走行に個体差の大きいことが報告されている (Rubino et al., 1988, Fox et al,. 1993)。このため、MCA 領域への血液供給にも個体間で多様性があるため、Tamura モデルでは安定した脳梗塞病体を作製することは困難である。したがって、我々は PIT 法で血管を血栓性に閉塞した後、閉塞血管を焼灼する Tamura モデルと組み合わせることで、より安定した脳梗塞を生成する p-MCAO モデルを作製した。

以上から、既存のモデルから改良を加えた p-MCAO モデルを用いて TAK-937 の若齢および老齢動物における脳梗塞体積の縮小効果、治療可能時間および病態下における循環器系・血液ガスパラメータに対する影響について検討した。

2.2. 方法

2.2.1 実験動物および飼育環境

試験には、雄性 Jcl:SD ラット (日本クレア株式会社) を 7 週齢で購入し、若齢ラットでの薬効評価試験および血液ガスパラメータの測定に供した。循環器パラメータ測定試験は、雄性 Jcl:SD ラット (日本クレア株式会社) を 6 週齢で購入し、7 週齢の時点で送信器を埋め込み、8 週齢の時点で測定に供した。老齢動物を用いた試験では、25 ヶ月齢の F344/N rats (日本エスエルシー) を使用した。これらの動物は、室温 24 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、照明時間 12 時間 (7 時点灯、19 時消灯) の環境下で 1 週間以上馴化させたものを使用した。また、給餌は自由摂食で、飲水は水道水を自由飲水させた。なお、動物実験は武田薬品工業株式会社動物倫理委員会が規定するガイドラインに従って実施した。

2.2.2 薬物投与用カニューレの留置および薬液調製方法

ポリエチレンカニューレ (夏目製作所；SP-45) を用いて作製した薬物投与用カニューレは、ハロセン麻酔をかけた動物の右鼠頸部を切開し露出させた大腿静脈に逆行性に挿入・留置した。さらに、他端は皮下を介して背部に導出し、これを投与用カニューレとした。カニューレ内は血液の凝固を抑制する目的でヘパフラッシュ (100 単位/mL) を充填した。その後、動物は飼育ケージに戻し、麻酔より覚醒・回復させた。

TAK-937 は、1.0 mg/mL になるように 10% HPBCD に溶解した後、0.5 mg/mL の濃度になるように大塚注射用蒸留水 (大塚製薬) により希釈した。

循環器パラメータ測定試験では、5% HPBCD を用いて、上記 0.5 mg/mL の TAK-937 溶液を 125 μg/mL (100 μg/kg/h 投与群、導入および維持投与用) および 37.5 μg/mL (30 μg/kg/h 投与群、導入および維持投与用) に希釈した。この TAK-937 溶液を、MCAO 処置 1 時間後からインフュージョンポンプを用いて大

腿静脈に留置したカテーテルより 1.8 mL/h で 10 分間導入投与した後、0.24 mL/h で 24 時間持続投与した。vehicle 群には 5% HPBCD を薬物投与群と同条件で投与した。

脳梗塞体積評価試験および血液ガスパラメータ測定試験では、5% HPBCD を用いて、0.5 mg/mL の TAK-937 溶液を 250 μg/mL (100 μg/kg/h 投与群、導入および維持投与用)、75 μg/mL (30 μg/kg/h 投与群、導入および維持投与用) および 25 μg/mL (10 μg/kg/h 投与群、導入および維持投与用) に希釈して投与溶液とした。薬液はインフュージョンポンプを用いて、大腿静脈に留置したカテーテルより 0.9 mL/h で 10 分間導入投与し、その後 0.12 mL/h で閉塞 24 時間後まで持続投与した。また、vehicle 群には 5% HPBCD を薬物投与群と同条件で投与した。

2.2.3 p-MCAO モデルの作製

p-MCAO モデルは、PIT モデル (Umemura et al., 1993) をもとに作製した。中大脳動脈の走行および閉塞部位の模式図を Fig. 3 に示す。動物をハロセンで麻酔 (3.5%で導入、1.5%で維持) した後、右眼窩側縁に沿って皮膚を切開した。そして、側頭筋の一部を切開して右眼窩側縁壁に沿って側頭下窩を露出した。手術用顕微鏡下で側頭骨底部を走行する卵円孔 (三叉神経の出る穴) と眼窩裂の間に歯科用ドリルにて約 5 mm の楕円形の骨窓を作製した。MCA を確認後、ローズベンガル (20 mg/kg) を尾静脈より投与した。その直後に、キセノンランプ冷光源 (浜松ホトニクス社 (L-4887)) を用いて、骨窓下の硬膜上より波長 540 nm の緑色光を 10 分間照射して、嗅索 (Olfactory Tract) 上を横切る MCA 本幹およびレンズ核線条体動脈 (Lenticulostriate Artery) を血栓性に閉塞した。閉塞を確認後、硬膜およびくも膜をマイクロメスにて切開し、骨窓内を横走する嗅索内側部から下大脳静脈 (Inferior cerebral vein) 間をバイポーラー凝固器により電気焼灼した。p-MCAO 処置中は、体温が低下しないように保温パッドを用いて体温を 37 度付近に維持した。

p-MCAO 処置時に多量に出血したもの、投与不備が疑われるもの、所定の位置に MCA が確認されなかったものおよび視認下で血栓による閉塞が確認され

なかったものについては除外した。また、閉塞 48 時間後の屠殺時にキセノンランプ照射部周辺に heat injury の見られたものおよび core 領域に相当する領域において梗塞の確認できなかったものも除外した。

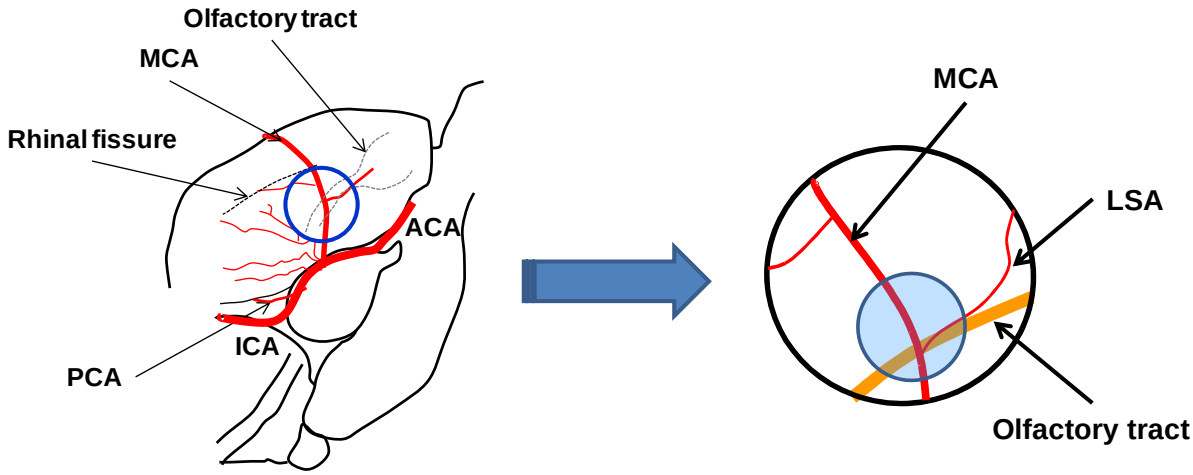


Fig. 3. Schema of middle cerebral occlusion by photochemical induced thrombosis
A cranial window was opened and the main trunk of the left MCA was identified through the dura mater. Photo illumination with green light (wavelength, 540 nm) was accomplished by using a xenon lamp with a heat-absorbing filter and a green filter. While Rose Bengal (20 mg/kg) was injected intravenously, photo illumination was directed to the MCA for 10 min using an optic fiber mounted on the cranial window. Complete photothrombotic occlusion of MCA was confirmed visually through an operating microscope, followed by the occluded arteries were cauterized electrically.
ACA; Anterior Cerebral Artery, MCA; Middle Cerebral Artery, PCA; Posterior Cerebral artery, ICA; Internal Carotid Artery, LSA; Lenticulostriate Artery

2.2.4 循環器パラメータの測定

本試験には、テレメトリ送信器 (TL11M2-C50-PXT ; Data Sciences International 社) を用いた。動物は、テレメトリ送信器の装着前日に絶食した。テレメトリ送信器は、ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔した動物を開腹し、生理食塩水に浸した滅菌ガーゼにより消化管などを保護しながら、露出・剥離した腹部大動脈に、逆行性に挿入・固定した。挿入部からの出血がないことを確認

した後、送信器を筋層とともに縫合・固定し、腹腔内に埋め込んだ。送信器を装着したラットは、約 1 週間の回復期間後、受信器上の個別ケージに入れ、p-MCAO 処置開始の約 1 時間以上前から測定環境に馴化させた。Dataquest A.R.T. システム (Data Sciences International 社) を使用して、p-MCAO 処置前、投与直前、p-MCAO 処置 6 時間後および 24 時間後の体温 (Body Temperature; BT)、平均血圧 (Mean arterial blood pressure; MABP) および心拍数 (Heart rate; HR) を記録した。

2.2.5 採血用カニューレの留置および血液ガスパラメータの測定

ポリエチレンカニューレ (夏目製作所；SP-10) にて作製した採血用カニューレは、実験の前日に 2%ハロセンにて麻酔した動物の大腿動脈に挿入・留置した。薬液の投与および p-MCAO 処置は前述 2.2.2 および 2.2.3 に準拠した。血液ガス測定用血液のサンプリングは、p-MCAO 処置前、投与直前、p-MCAO 処置 6 時間後および 24 時間後に大腿動脈に留置したカニューレからペパリン存在下に採取した。採血した血液は、速やかにポータブル血液分析器 (iSTAT Analyzer 200; 扶桑薬品工業株式会社) にて動脈血炭酸分圧 (arterial carbon dioxide partial pressure: $PaCO_2$)、動脈血酸素分圧 (arterial oxygen partial pressure: PaO_2)、酸素飽和度 (oxygen saturation: sO_2)、重炭酸イオン濃度 ($[HCO_3^-]$) および pH を測定した。なお pH、$PaCO_2$ および PaO_2 の測定結果は体温の影響を受けるため、同時に直腸温を測定し、下記の式を用いて体温による補正を行った。また sO_2 および $[HCO_3^-]$は、pH、PaO_2 および $PaCO_2$ を用いて下記の式により算出することから、これらパラメータについても補正後の値を用いて求めた。なお体温は、physitemp (ニューロサイエンス) を用いて、採血と同時点において測定した。

$$PaCO_2(Tp) = PaCO_2 \times 10^{0.019(Tp-37)}$$

$$PaO_2(Tp) = PaO_2 \times 10^{\frac{5.49 \times 10^{-11} \times PaO_2^{3.88} + 0.071}{9.72 \times 10^{-9} \times PaO_2^{3.88} + 2.30}(Tp-37)}$$

$$\log[HCO_3^-] = pH(Tp) + \log PaCO_2(Tp) - 7.608$$

$$sO_2(Tp) = 100\frac{X^3 + 150X}{X^3 + 150X + 23400}$$

$$(X = PaO_2(Tp) \times 10^{(0.48(pH(Tp)-7.4)-0.0013(HCO_3^- -25))})$$

$$pH(Tp) = pH-0.0147(Tp-37)+0.0065(7.4-pH)(Tp-37)$$

Tp：その時点での直腸温 (i-STAT 取扱説明書より)

2.2.6 脳梗塞体積の測定

p-MCAO 処置 48 時間後、ラットを屠殺し、脳を摘出した。ブレインスライサー (ASI instrument、RBM-4000C) を用いて、前脳より 1 mm の位置から終脳へ向け、2 mm 幅の前額冠状断切片を 6 枚作製した。脳切片は、生理食塩水にて溶解した 1% TTC 中で 37.0°C で 15 分間反応させて染色した。TTC はミトコンドリア内の脱水素酵素により還元されて赤色の triphenylformazan となるため、TTC 溶液により赤色に染色されなかった部分 (白色) を、虚血により梗塞が生じた部位と見なした。TTC 染色を施した切片は、デジタルカメラで撮像し、画像解析ソフト (Photoshop ; Adobe 社) を用いて一定閾値以上の非染色部分のピクセル数を計測し、単位面積あたりのピクセル数から梗塞面積を算出した。算出した梗塞面積と切片の厚さから、台形法により近似的に梗塞体積を算出した。

脳梗塞面積 = (虚血側ピクセル数－健常側ピクセル数) / 単位面積あたりのピクセル数

脳梗塞体積 = ((1 枚目の脳梗塞面積+2 枚目の脳梗塞面積) + (2 枚目の脳梗塞面積 + 3 枚目の脳梗塞面積) + (3 枚目の脳梗塞面積 + 4 枚目の脳梗塞面積) + (4 枚目の脳梗塞面積 + 5 枚目の脳梗塞面積) + (5 枚目の脳梗塞面積 + 6 枚目の脳梗塞面

積)) × 厚さ (2 mm) ÷ 2

2.2.7 統計解析

データはすべて平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で示した。TAK-937 の生理学的パラメータに及ぼす影響については、各時点における vehicle 群に対して、片側パラメトリック Williams 検定あるいは Shirley-Williams 検定を用いて有意差検定を行った。有意基準は危険率が 2.5%未満 ($P < 0.025$) とした。若齢ラットを用いた梗塞体積の評価の有意差検定は、vehicle 群に対して、片側パラメトリック Williams 検定を用いて行い、有意基準は危険率が 2.5%未満 ($P < 0.025$) とした。老齢ラットでの梗塞体積の評価の有意差検定は、vehicle 群に対して、Student's t 検定を用いて行った。有意基準は危険率が 5%未満 ($P < 0.05$) とした。すべての統計解析は SAS 前臨床パッケージ version 5.0 (SAS institute, Japan) を用いて実施した。

2.3. 結果

2.3.1 TAK-937 による p-MCAO 処置 1 時間後投与における脳梗塞体積縮小効果

ラット p-MCAO モデルにおける TAK-937 の脳保護効果および用量依存性を検討するために、p-MCAO 処置 1 時間後より TAK-937 を 24 時間後まで静脈内より持続的に投与して p-MCAO 処置 48 時間後における梗塞体積の縮小効果を検討した (Fig. 4A)。その結果、vehicle 群 100.0 ± 3.6%に対し、TAK-937 投与群の梗塞体積は、それぞれ 90.3 ± 3.3% (10 μg/kg/h) と 72.8 ± 5.4% (30 μg/kg/h) であった (Fig. 4B)。以上の結果より、閉塞 1 時間後から投与した条件において TAK-937 は用量依存的な梗塞体積の縮小効果を示し、その作用は vehicle 群に対し、30

μg/kg/h で有意 (P<0.025) であることが明らかとなった。

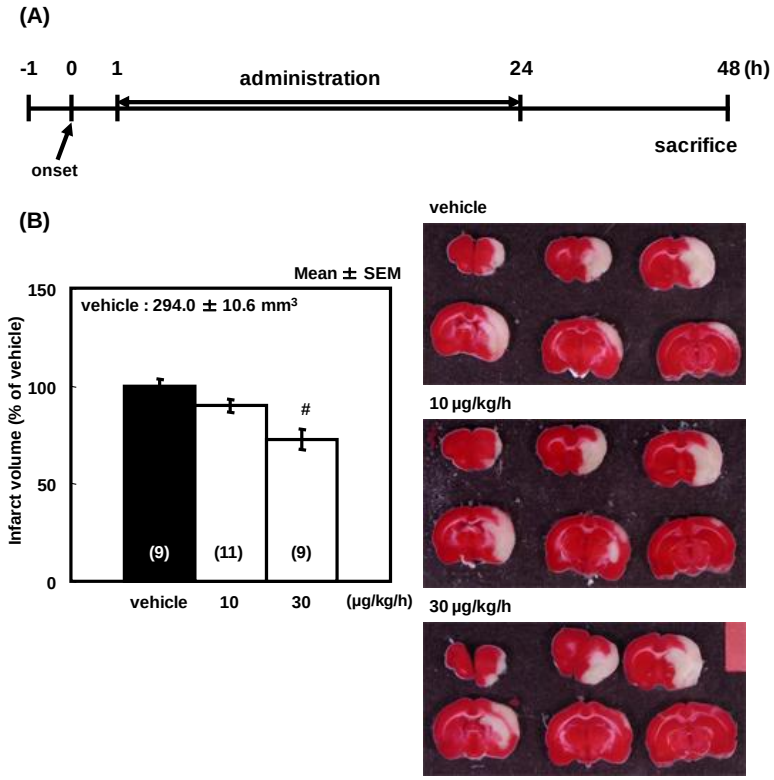


Fig. 4. Protective effect of TAK-937 on cerebral infarction after permanent middle cerebral artery occlusion in young adult rats. Intravenous infusion of vehicle or TAK-937 was started 1h after the p-MCAO and terminated 24 h after the p-MCAO, and brains were obtained 48 h after the p-MCAO (A). TAK-937 significantly reduced infarct volume in a rat p-MCAO model (B). Data are indicated as the mean ± SEM. Significant differences from vehicle-treated group are indicated by #P<0.025 (one-tailed Williams' test). The number in parentheses shows the number of rats used.

2.3.2 脳梗塞病態下における TAK-937 の循環器系パラメータに及ぼす影響

ラット p-MCAO モデルにおいて、血圧、心拍数および体温に及ぼす TAK-937 の影響を経時的に検討した。TAK-937 は p-MCAO 処置 1 時間後から 24 時間後まで静脈内より持続的に投与した。測定結果は、Table 1 にまとめる。p-MCAO 処

置前および投与直前においてvehicle群とTAK-937投与群を比較した結果、血圧、心拍数および体温いずれのパラメータにおいても有意な差は認められなかった。p-MCAO処置6時間後 (TAK-937投与5時間後) においてTAK-937 (30および100 μg/kg/h) は、vehicle投与群と比較して、血圧に対して作用を示さなかったが、心拍数および体温を有意に (P<0.025) 低下させた。p-MCAO処置24時間後では、vehicle群と比較して、TAK-937は血圧、心拍数および体温いずれにも有意な差は示さず、p-MCAO処置6時間後で認められた心拍数および体温の低下は24時間後には回復した。

Table 1. Cardiovascular parameters in young-adult rats with p-MCAO.

	TAK-937 (μg/kg/hr)	Before p-MCAO	Just before administration	6 h after p-MCAO	24 h afer p-MCAO
MABP	0	106.9 ± 4.5	110.4 ± 3.2	104.8 ± 3.4	103.2 ± 6.9
(mmHg)	30	109.9 ± 2.5	124.8 ± 3.4	96.5 ± 6.2	112.9 ± 2.0
	100	97.7 ± 4.3	110.8 ± 4.3	90.3 ± 7.0	103.2 ± 1.7
HR	0	348.5 ± 13.5	370.8 ± 7.1	413.8 ± 24.3	347.6 ± 10.5
(bpm)	30	352.5 ± 20.2	420.4 ± 47.7	345.9 ± 17.9	332.1 ± 20.1
	100	345.8 ± 19.9	431.4 ± 45.1	276.0 ± 63.4 #	361.5 ± 30.8
BT	0	37.8 ± 0.3	37.7 ± 0.2	38.6 ± 0.2	38.4 ± 0.2
(ºC)	30	37.9 ± 0.4	38.1 ± 0.3	36.4 ± 0.5 *	38.0 ± 0.5
	100	37.3 ± 0.2	37.9 ± 0.3	35.0 ± 1.5 *	37.6 ± 0.4

Data are indicated as the mean ± SEM.

Cardiovascular parameters and body temperature 0; n=3, 30; n=4, 100; n=3

#*P* < 0.025 vs. corresponding vehicle group by one-tail Williams test

**P* < 0.025 vs. corresponding vehicle group by one-tail Shirley-Williams test

2.3.3 脳梗塞病態下におけるTAK-937の血液ガスパラメータに及ぼす影響

ラットp-MCAOモデルにおいて、血液ガスパラメータとして$PaCO_2$、PaO_2、

sO_2、$[HCO_3^-]$および pH に対する TAK-937 の影響について検討した。TAK-937 は p-MCAO 処置 1 時間後から 24 時間後まで静脈内より持続的に投与した。測定結果は Table 2 にまとめる。p-MCAO 処置前および投与直前における血液ガスパラメータを vehicle 群と TAK-937 投与群とを比較した結果、いずれの群においても有意な差は認められなかった。p-MCAO 処置 6 時間後 (TAK-937 投与 5 時間後) において、vehicle 群に対し、TAK-937 (30 および 100 μg/kg/h) は $PaCO_2$ および$[HCO_3^-]$の上昇ならびにPaO_2およびsO_2の低下を示した。これらの変化は、用量依存的かつ有意 ($P<0.025$) であった。p-MCAO 処置 6 時間後で認められた変動は、24 時間後においても同様に認められた。

Table 2. Blood gas parameters in young-adult rats with p-MCAO.

	TAK-937 (μg/kg/hr)	Before p-MCAO	Just before administration	6 h after p-MCAO	24 h after p-MCAO
PaO_2	0	89.3 ± 3.3	86.7 ± 1.8	95.2 ± 1.3	96.5 ± 1.2
(mmHg)	30	84.6 ± 2.7	88.2 ± 1.4	84.7 ± 1.4 #	86.9 ± 1.1 #
	100	84.9 ± 1.7	90.7 ± 0.7	77.5 ± 1.8 #	84.0 ± 0.8 #
$PaCO_2$	0	40.0 ± 1.1	38.1 ± 1.3	36.1 ± 0.8	36.2 ± 0.7
(mmHg)	30	39.3 ± 1.1	39.7 ± 0.8	41.3 ± 0.6 #	41.2 ± 0.5 #
	100	42.0 ± 0.6	38.4 ± 1.2	45.2 ± 0.9 #	43.3 ± 0.6 #
sO_2	0	97.4 ± 0.3	97.1 ± 0.2	98.1 ± 0.1	98.1 ± 0.1
(%)	30	96.5 ± 0.3	97.3 ± 0.1	97.1 ± 0.1 #	97.4 ± 0.1 #
	100	96.9 ± 0.2	97.7 ± 0.1	96.1 ± 0.2 #	96.7 ± 0.1 #
pH	0	7.49 ± 0.02	7.47 ± 0.01	7.51 ± 0.01	7.49 ± 0.01
	30	7.48 ± 0.01	7.47 ± 0.01	7.49 ± 0.01	7.50 ± 0.01
	100	7.46 ± 0.01	7.49 ± 0.01	7.49 ± 0.01	7.46 ± 0.01
HCO_3^-	0	30.2 ± 0.8	27.6 ± 1.3	28.5 ± 0.9	27.5 ± 1.0
(mmol/L)	30	29.1 ± 0.5	29.0 ± 0.7	31.7 ± 0.8 #	32.4 ± 0.8 #
	100	30.0 ± 0.4	29.1 ± 0.6	34.1 ± 0.6 #	30.7 ± 0.5 #

Data are indicated as the mean ± SEM.

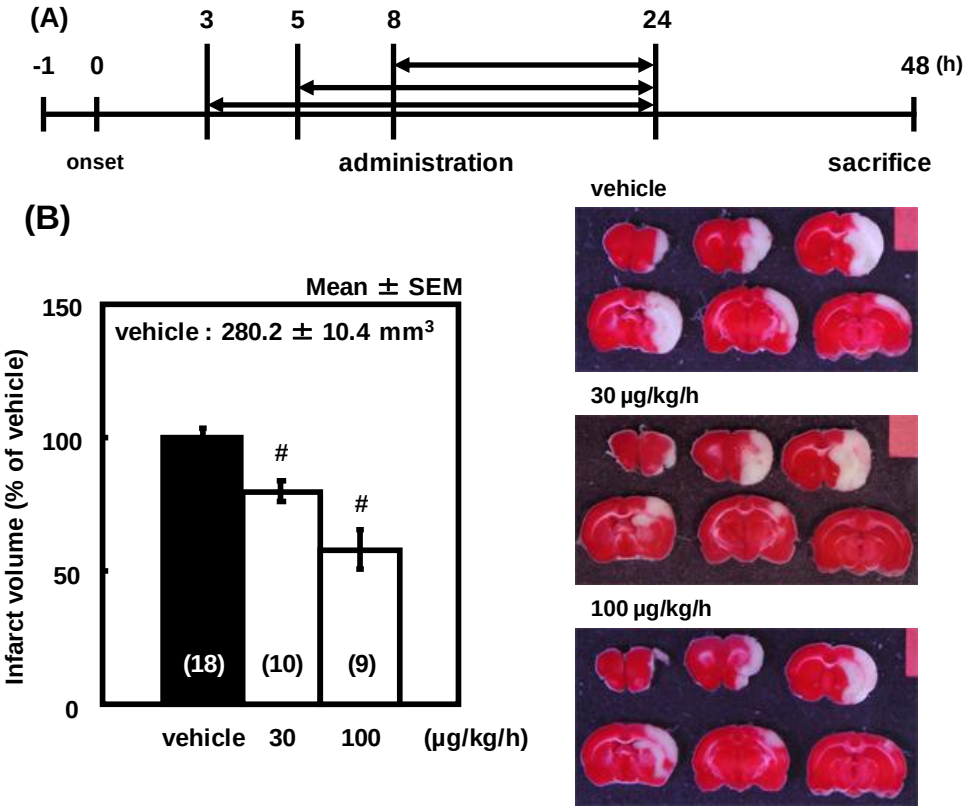
Blood Gas Parameters 0; n=7, 30; n=8, 100; n=5

#$P < 0.025$ vs. corresponding vehicle group by one-tail Williams test

2.3.4 TAK-937 の脳梗塞体積縮小効果における治療可能時間

TAK-937 の治療可能時間を検討する目的で、前述の p-MCAO 処置 1 時間後からの投与に加え、p-MCAO 処置 3、5 および 8 時間後から投与を開始し、その脳梗塞体積の縮小効果について検討した (Fig. 5A)。その結果、p-MCAO 処置 3 時間後からの投与における脳梗塞体積は、vehicle 群 100.0 ± 3.4%に対し、TAK-937 投与群の梗塞体積は、それぞれ 81.2 ± 3.4% (30 μg/kg/h) および 58.3 ± 7.3% (100.0 μg/kg/h) であり、いずれの用量でも有意な差 (P<0.025) が認められた (Fig. 5B)。p-MCAO 処置 5 時間後からの投与では、vehicle 群 100.0 ± 4.3%に対し、TAK-937 投与群における梗塞体積は、79.1 ± 4.5% (30 μg/kg/h) と 75.4 ± 3.9% (100 μg/kg/h) であり、いずれの用量でも有意な差 (P<0.025) が認められた (Fig. 5C)。p-MCAO 処置 8 時間後投与においては、vehicle 群 100.0 ± 3.7%に対し、TAK-937 投与群の梗塞体積は、それぞれ 102.8 ± 7.3% (30 μg/kg/h) と 95.1 ± 9.6% (100 μg/kg/h) であり、いずれの用量でも有意な差は認められなかった (Fig. 5D)。

以上の結果から p-MCAO 処置ラットにおいて TAK-937 は、少なくとも 5 時間の治療可能時間を有すると考えられた。



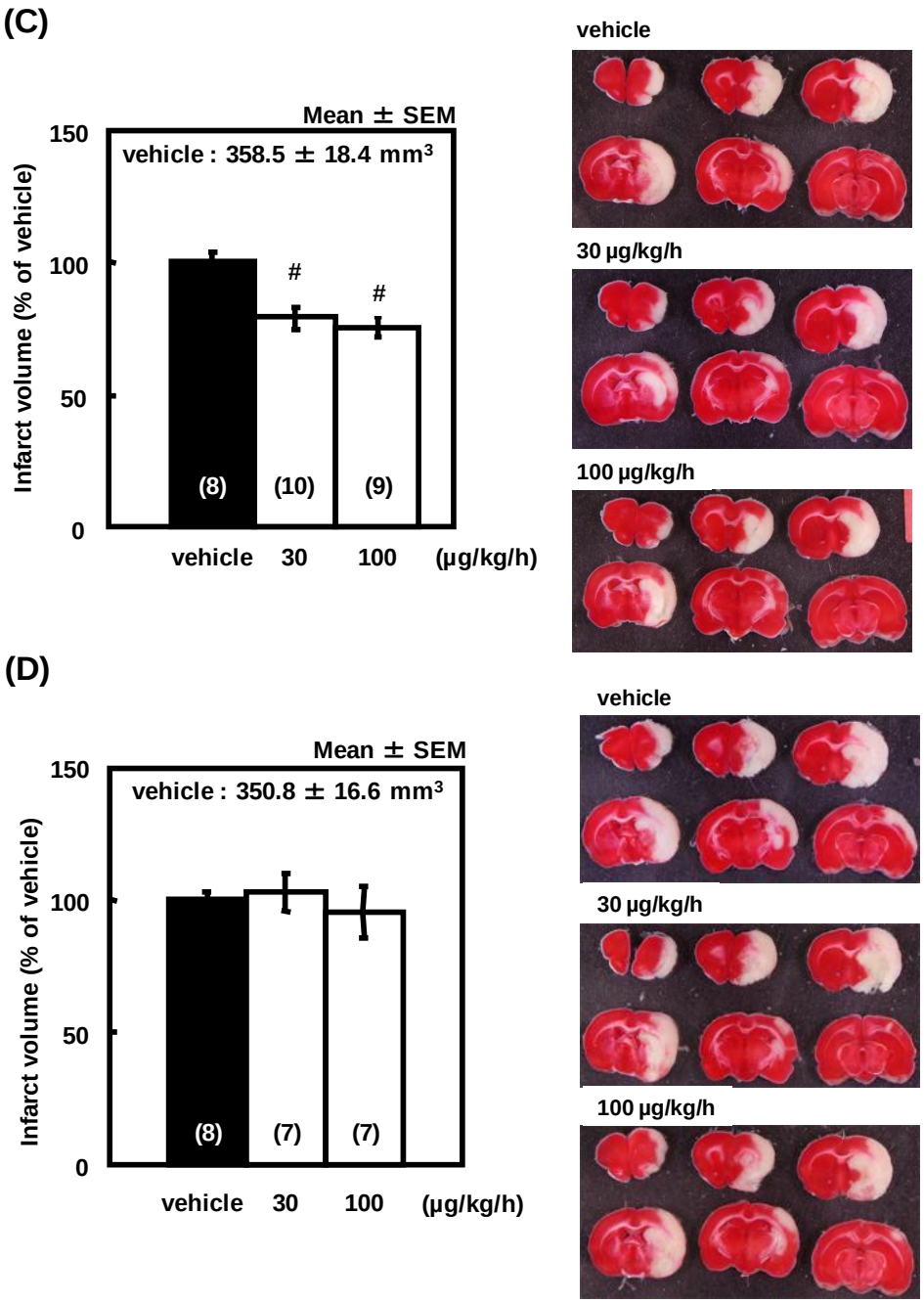


Fig. 5. Therapeutic time window of TAK-937 on cerebral infarction in young-adult rats with p-MCAO.

Intravenous infusion of vehicle or TAK-937 was started 3 h (B), 5 h (C), and 8 h (D) after p-MCAO and was terminated 24 h after p-MCAO and brains were isolated 48 h after p-MCAO (A). TAK-937 produced a significant reduction of infarct volume in the model of p-MCAO, even if administered 5 h after p-MCAO. Data are indicated as the mean ± SEM. Statistically significant differences from vehicle-treated group were indicated by a one-tailed Williams test (#P<0.025). The number in parentheses shows the number of rats used.

2.3.5 老齢動物における TAK-937 の脳梗塞体積の縮小効果

老齢動物における TAK-937 の脳保護効果を検討するために、p-MCAO 処置した老齢ラットに処置 1 時間後から 24 時間後まで TAK-937 (100 μg/kg/h) を静脈内より持続的に投与して、脳梗塞の縮小効果を検討した (Fig. 6A)。その結果、vehicle 群 100.0 ± 4.4%に対して、TAK-937 投与群の梗塞体積は 81.7 ± 6.0% であった。以上から、25 ヶ月齢という老齢ラットにおいても TAK-937 は有意 (P<0.05) な脳梗塞体積の縮小効果を示した (Fig. 6B)。

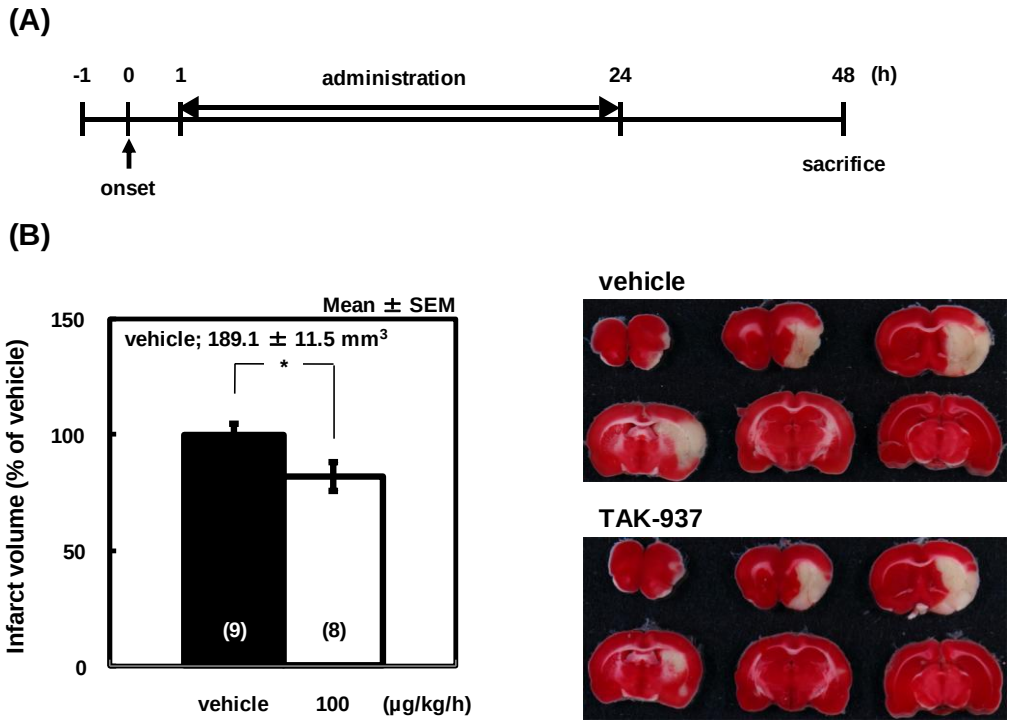


Fig. 6. Effect of TAK-937 on infarct volume in aged rats with p-MCAO

TAK-937 was infused at 100 μg/kg/h intravenously 1 h after p-MCAO; the infusion was terminated 24 h after p-MCAO, and brains were isolated 48 h after p-MCAO (A). TAK-937 produced a significant reduction of infarct volume in the model of p-MCAO (B). Data are indicated as mean ± SEM. Statistically significant differences from the vehicle-treated group were indicated by a t test (*P < 0.05). The number in parentheses shows the number of rats used.

2.4 考察

今回の検討に用いた p-MCAO モデルは、開頭して MCA を視認下におき、硬膜上に直接プローブを当てて光を照射する。このため、光照射により組織障害が起こる恐れがある。そこで、ローズベンガル非投与で他の実験同様の外科的処置を行い、外科的処置および光照射による脳障害の有無を確認した。その結果、TTC 染色では障害は認められなかった (data not shown)。これより、今回の検討における脳障害は MCA を閉塞したことによる虚血性障害であることが確認された。また本モデルにおいて vehicle 投与群の脳梗塞は、虚血中心部である core 領域に加えて、MCA の直接的な支配領域でない側頭葉から頭頂葉にかけても確認され、非虚血側では梗塞形成は認められなかった。この条件下、TAK-937 は用量依存的な脳梗塞の縮小効果を示し、30 μg/kg/h において vehicle 投与群に対し有意に脳梗塞を抑制した。特に TAK-937 は、側頭葉から頭頂葉にかけた penumbra 領域の梗塞形成を抑制した。一方、TAK-937 は core 領域である線条体領域の梗塞形成には影響を示さなかった。このことから、TAK-937 は penumbra 領域における梗塞拡大を抑制することが示唆された。

さらに本モデルにおける TAK-937 の治療可能時間を検討する目的で、p-MCAO 処置 1 時間後からの投与に加え、p-MCAO 処置 3、5 および 8 時間後投与による TAK-937 の脳梗塞体積縮小効果について検討した。その結果、p-MCAO 処置 3 および 5 時間後投与において、用量依存的かつ有意な脳梗塞体積縮小効果が確認された。以上の結果より、TAK-937 は p-MCAO モデルにおいて少なくとも 5 時間の治療可能時間を有することが示唆された。本試験に用いたモデルと同様の p-MCAO モデルにおいて、脳梗塞形成は MCA 閉塞後約 6 時間以内に急速に進展し、その後の進展はごくわずかであることが報告されている (Takamatsu et al., 1998)。すなわち本モデルにおいて penumbra 領域の存在時間は、閉塞後 6 時間以内と考えられる。事実、MCA 閉塞 8 時間後からの TAK-937 投与では脳梗塞縮小効果が認められなかった。これらのことから、救済可能なペナンブラ領域がある限り TAK-937 がその部位を救済しうることが示唆された。

生理学的パラメータの変動は脳障害を増悪する可能性がある。中でも、積極的な降圧はむしろ脳血流量の低下を引き起こし、予後を悪化させるという報告があることから (Adeoye et al., 2006)、通常、脳梗塞急性期には血圧を低下させないことが望まれる。そこで、p-MCAO モデルにおいて TAK-937 の血圧および心拍数に及ぼす影響を検討した。その結果、TAK-937 はいずれの用量においても有意な血圧低下を示さず、血圧に影響しないことが示唆された。一方、TAK-937 は vehicle 群に対して、薬効用量である 30μg/kg/h から有意かつ用量依存的に心拍数を低下させた。現状、心拍数の増加あるいは低下と予後との関連は不明であるが、本試験において、TAK-937 が心拍数の低下を示した用量においても脳保護効果が認められている。したがって、TAK-937 による心拍数の低下が臨床においてどのように作用するかは注視が必要であるが、おそらく脳保護効果には影響しないことが推察される。また TAK-937 は p-MCAO 処置後 6 時間後において用量依存的に体温を低下させた。既報において (Suzuki et al., 2012b)、TAK-937 による体温低下作用は、部分的に脳保護効果に寄与しうることを示しており、本試験における脳保護効果にもこの低体温作用が寄与することが示唆される。

一方で、TAK-937 は $PaCO_2$ および[HCO_3^-]の用量依存的な上昇、PaO_2、pH、sO_2 の用量依存的な低下を示した。これより、TAK-937 投与により軽度の呼吸抑制および $PaCO_2$ 上昇を起因とする呼吸性アシドーシスの惹起が示唆される。脳梗塞患者の血液ガスパラメータにおいて sO_2 が特に重要であり、92% (Adams et al., 2007) あるいは 95% (Treib et al., 2000) 以上に保持するべきであると提唱されている。本試験において TAK-937 は血液ガスパラメータに影響を及ぼすものの、sO_2 は高用量群でも 96%以上を維持しており、また血液ガスパラメータの変動が見られる用量においても TAK-937 は強い脳保護作用を示した。これより、TAK-937 は血液ガスパラメータに影響を及ぼすもののその脳保護効果に影響はないことが示唆された。

老齢動物における p-MCAO モデルにおいて TAK-937 は、有意な脳保護効果を示した。老齢動物では若齢と比較して、脳内の側副血行路の機能が低下しており、脳梗塞巣が拡大するという報告がある (He et al., 1997)。また若齢と比較し

て、老齢動物では脳組織自体が酸化障害などに対して脆弱性であるために、脳梗塞が急速に進展するという報告がある (Popa-Wagner et al., 2007)。さらには、老齢動物を用いた全脳虚血再灌流モデルにおいて、脳内微小血管では白血球の遊走・接着および活性酸素種の産生が有意に増加し、血管のずり応力が有意に低下することが示唆されている (Ritter et al., 2008)。またいくつかの脳梗塞急性期治療薬は老齢動物で薬効を示さず、このことが臨床で効果の認められなかった原因の一つであると考えられている (Suzuki et al., 2003)。そこで、TAK-937 が老齢動物を用いた p-MCAO モデルにおいても脳保護効果を示すかどうかを検討した。その結果、TAK-937 は有意な脳梗塞体積の縮小効果を示した。以上から、TAK-937 は脳梗塞急性期の患者の年齢に関わらず、脳保護効果を発揮することが示唆された。本試験は老齢動物において CB 受容体作動薬の脳保護効果を示した初めての研究であり、本結果は CB 受容体作動薬の作用および脳梗塞急性期治療薬の開発において大きな価値を示すものである。本試験では老齢動物供給の制限からこれ以上の検討は行わなかったが、今後は用量依存性や治療可能時間の検討といった更なる検討が必要である。

以上から、CB 受容体作動薬である TAK-937 は、若齢のみならず、老齢動物における脳梗塞モデルにおいても脳保護効果を示した。さらに本モデルにおいて TAK-937 の治療可能時間は 5 時間であることが示唆された。

第3章 TAK-937および組織プラスミノーゲンアクチベーターの併用投与の脳保護効果

3.1. 序文

脳梗塞の成因は、血栓性あるいは塞栓性に脳血管が閉塞されることであり、このため形成された血栓・塞栓を溶解することを目的とした血栓溶解療法は脳梗塞急性期治療の第一選択である。現在、脳梗塞急性期の治療薬として世界的に承認されているのは血栓溶解薬である t-PA のみである。t-PA が適応可能な患者は、脳梗塞を発症した患者のうち約 3%と極めて少ないが、脳梗塞急性期において t-PA の適応可能な患者に脳保護薬が適応される場合は、必ず併用されることが想定される。したがって、脳保護薬を t-PA と併用した際に、お互いの作用を相殺することなく、保護効果を発揮することができるかどうか、また t-PA の作用に対して相加・相乗効果を期待できるかどうかを見極めることは、治療薬を開発する上で大変重要となる。

そこでまず、t-PA の評価が可能な動物モデルとして PIT モデルを選択した。PIT モデルは、540 nm の緑色光と光増感物質であるローズベンガルにより、一重項酸素を産生させ、これが血管内皮を障害することで血栓を生成し、血管を閉塞するモデルである。障害された血管内皮では、直ちに血小板が粘着し、そこを足場として、フィブリンを豊富に含む血栓が生成される。本モデルの特徴として、ローズベンガルは、血中ではほとんどがアルブミンと結合していて血管外へ漏れることはないため、光を照射した部位のみ障害を惹起できる。また一重項酸素は非常に短寿命のため、他の血管に影響しない。したがって、PIT 法により目的血管のみを閉塞する再現性のよい脳梗塞モデル作成することができる。また t-PA はプラスミノーゲンをプラスミンに変換する酵素であり、プラスミンは、血栓となったフィブリンを分解する。したがって、t-PA は PIT 法により生成されたフィブリンを豊富に含む血栓を溶解し、血流を再開させることが

できる。実際に、本モデルを用いた t-PA の評価について多数報告されていることから (Umemura et al., 1993, 1994, Matsuno et al., 1993)、PIT モデルは t-PA と TAK-937 との併用効果を検討するのに適したモデルであると考えられる。

以上から、PIT モデルを用いて t-PA の薬効プロファイルおよび TAK-937 の脳保護効果を検討し、至適条件下での t-PA と TAK-937 の併用投与による脳保護効果について検討した。

3.2. 方法

3.2.1 実験動物および飼育環境

試験には、雄性 Jcl:SD ラット (日本クレア株式会社) を 7 週齢で購入し、以下に実験に供した。これらの動物は、室温 24 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、照明時間 12 時間 (7 時点灯、19 時消灯) の環境下で 1 週間以上馴化させたものを使用した。また、給餌は自由摂食で、飲水は水道水を自由飲水させた。なお、動物実験は武田薬品工業株式会社動物倫理委員会が規定するガイドラインに従って実施した。

3.2.2 薬物投与用カニューレの留置および薬液調製方法

薬物投与用カニューレは、上述 2.2.2 項に準じて t-PA および TAK-937 投与用に左右の大腿静脈に留置した。

t-PA (1 mg≒60,000 unit) は、添付の溶解液により溶解・希釈し、総投与量が 3 および 10 mg/kg になるように、総投与液量の 20%を bolus 投与した後、インフュージョンポンプを用いて大腿静脈に留置したカテーテルより、残りの 80%を 30 分間持続投与した。また vehicle 群には t-PA 製剤の添加物を考慮し、浸透圧等に影響のない大塚生理食塩水 (大塚製薬) を t-PA 投与群と同条件で投与した。

TAK-937 は、上述 2.2.2 項と同様に 0.5 mg/mL 溶液を調製し、5% HPBCD を用

いて、25、75 および 250 μg/mL の濃度になるように希釈した。薬液は上述 2.2.2 項の脳梗塞体積評価試験と同様に持続投与した。また、vehicle 群には 5% HPBCD を薬物投与群と同条件で投与した。

3.2.3 光増感血栓性脳虚血モデルの作製

PIT モデルは常法に従って光化学的に作製した (Matsuno et al., 1993)。動物をハロセンで麻酔して (3.5%で導入、1.5%で維持)、右眼窩側縁に沿って皮膚を切開した。側頭筋の一部を切開し右眼窩側縁壁に沿って側頭下窩を露出した。手術用顕微鏡下に側頭骨底部を走行する卵円孔 (三叉神経の出る穴) および眼窩裂の間に歯科用ドリルにて約 5 mm の楕円形の骨窓を作製した。MCA を確認後、ローズベンガル (20 mg/kg) を尾静脈より投与した。その直後に、キセノンランプ冷光源 (浜松ホトニクス社製、L-4887) を用いて、骨窓の硬膜上より波長 540 nm の緑色光を 10 分間照射した。そして、嗅索上 (Olfactory Tract) を横切る MCA 本幹およびレンズ核線条体動脈 (Lenticulostriate Artery) を血栓性に閉塞した。MCA 閉塞処置中は、簡易の保温パッドにて体温を 37 度付近に維持した。

虚血処置時に多量に出血したもの、所定の位置に MCA が確認されなかったもの、および視認下で血栓による閉塞が確認されなかったものについては除外した。また投与不備や、閉塞 48 時間後の屠殺時にキセノンランプ照射部周辺に heat injury の見られたものおよび core 領域に相当する領域において梗塞の確認できなかったものについても除外した。

3.2.4 脳梗塞体積の測定

上述 2.2.6 項に準じて、MCAO 処置 24 時間後に脳を摘出し、脳梗塞体積の評価を行った。

3.2.5 統計解析

測定値は vehicle 群に対する百分率を算出し、平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で示した。有意差検定は、各試験について各々以下のとおりに行った。t-PA の用量依存性試験については、vehicle 群に対して、片側 Shirley-Williams 検定を、TAK-937 の用量依存性試験では、vehicle 群に対して、片側 Williams 検定を用いた。t-PA の至適投与タイミングの検討については、vehicle 群に対して、Student's t 検定あるいは Aspin-Welch 検定を用いた。t-PA と TAK-937 の併用投与の検討試験において、vehicle 群に対する t-PA 単独投与群の梗塞体積縮小効果については Student's t 検定を、t-PA 単独投与群に対する t-PA+TAK-937 併用投与群の梗塞体積縮小効果は、片側パラメトリック Williams 検定を用いた。有意基準は、Student's t 検定については危険率 5%未満 (P<0.05)、片側パラメトリック Williams 検定および片側 Shirley-Williams 検定については危険率 2.5%未満 (P<0.025) とした。すべての統計解析は SAS 前臨床パッケージ version 5.0 (SAS institute, Japan) を用いて実施した。

3.3. 結果

3.3.1 t-PA による脳梗塞体積縮小効果の用量依存性

併用試験を行うにあたり、t-PA の用量を決定するために用量依存性試験を行った。t-PA は、MCAO 処置 1 時間後より 3 および 10 mg/kg を静脈内より投与した (Fig. 7A)。その結果、vehicle 群 の 100.0 ± 2.9%に対し、t-PA 投与群の梗塞体積は、81.0 ± 7.6% (3 mg/kg) および 71.3 ± 9.9% (10 mg/kg) であった (Fig. 7B)。vehicle 群に対して、t-PA は、いずれの用量においても有意 (P<0.025) な脳梗塞体積縮小効果を示した。一方、t-PA 3 mg/kg 投与群と 10 mg/kg 投与群の梗塞体積では、両群間で顕著な差異は認められず、t-PA は 3 mg/kg でほぼ最大の薬効が得られると判断された。このことから、以下の実験では t-PA の用量を 3 mg/kg

にて行った。

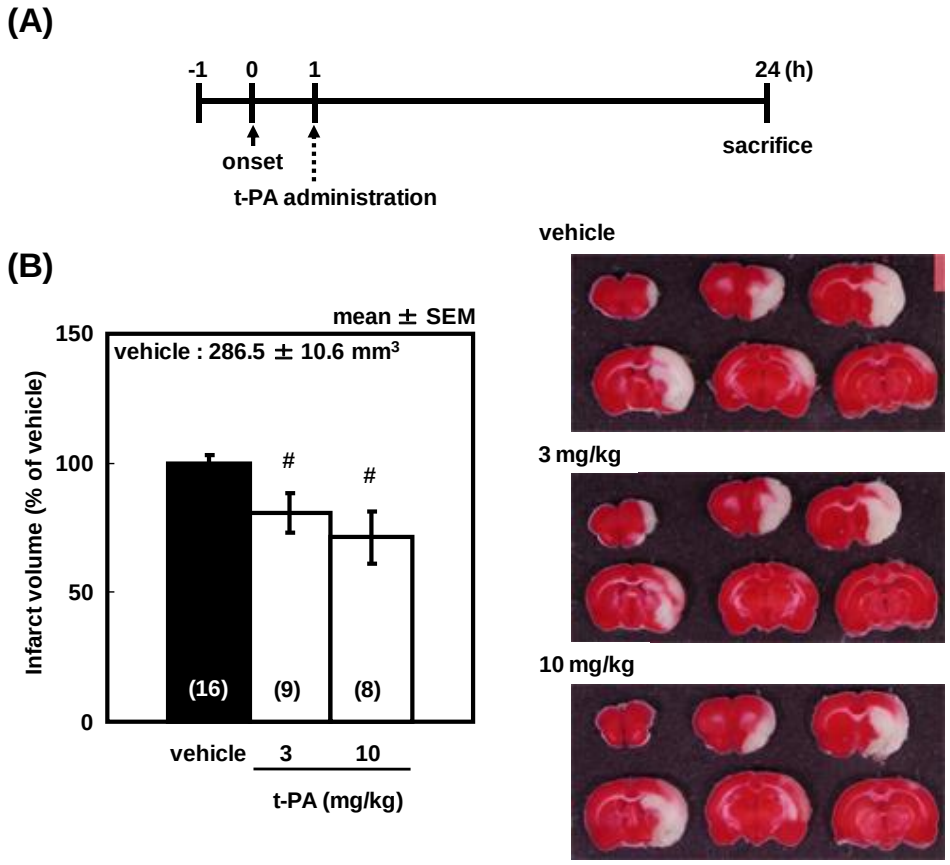


Fig. 7. Effect of t-PA on infarct volume in rats with thrombotic MCAO

Intravenous administration of t-PA was started 1 h after MCAO. t-PA was administered at 3 and 10 mg/kg; 20% as a bolus and the remainder continuously infused over a period of 30 minutes (A). The effect of t-PA on infarct volume was examined 24 h after MCAO (B). The slices were stained with TTC 24 h after MCAO. Values of parentheses are the number of animals. Data are presented as mean ± SEM. #P < 0.025 against the vehicle-treated group by one-tailed Shirley-Williams test.

3.3.2 t-PA の至適投与タイミングの検討

t-PA の薬効が認められる投与タイミングを検討する目的で、異なる投与開始時間における t-PA の脳梗塞体積の縮小効果を検討した。t-PA は、MCA を閉塞し

てから 1、1.5 あるいは 2 時間後より投与した (Fig. 8A)。その結果、vehicle 群 (100.0 ± 8.1%) に対し、t-PA 投与群の梗塞体積は 74.5 ± 7.1% (1 時間後)、70.7 ± 20.3% (1.5 時間後)、95.8 ± 13.6% (2 時間後) であった (Fig. 8B)。vehicle 群に対する有意な (P<0.05) 梗塞縮小効果は、閉塞 1 時間後より投与した群で認められ、その後、投与開始時間に依存して梗塞体積の縮小効果は減弱し、閉塞 2 時間後からの投与における梗塞体積は vehicle 群とほぼ同等であった。

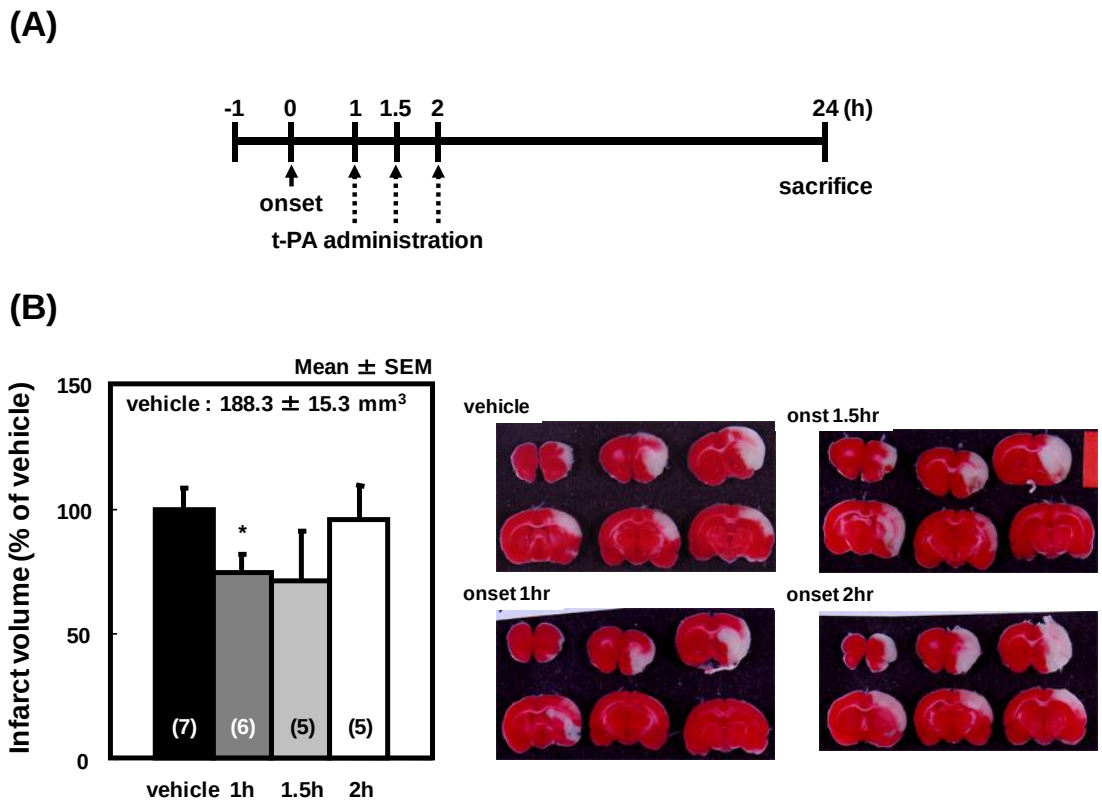


Fig. 8. Optimal administration timing of t-PA in rats with thrombotic MCAO

t-PA was administered intravenously 1 h, 1.5 h or 2 h after MCAO at a total dose of 3 mg/kg, 20% as a bolus and the remainder continuously infused over a period of 30 minutes (A).The effect of t-PA on infarct volume was examined 24 h after MCAO (B). The slices were stained with TTC 24 h after MCAO. Values of parentheses are the number of animals. Data are presented as mean ± SEM. *P < 0.05 against the vehicle-treated group by t test.

3.3.3 TAK-937 投与による脳梗塞体積縮小効果の用量依存性

PIT モデルにおいても TAK-937 が脳保護効果を示すか確認するために、本モデルにおける TAK-937 の用量依存性試験を行った。TAK-937 は、MCA を閉塞してから 1 時間後より投与した (Fig. 9A)。その結果、vehicle 群の 100.0 ± 3.0% に対し、TAK-937 投与群の梗塞体積は、76.8 ± 3.7% (10 μg/kg/h) および 59.8 ± 3.9% (30 μg/kg/h) であった (Fig. 9B)。vehicle 群に対し、TAK-937 は有意 (P<0.025) かつ用量依存的な梗塞体積縮小効果を示した。以上から、t-PA の薬効が認められる条件において TAK-937 の脳保護作用が確認された。

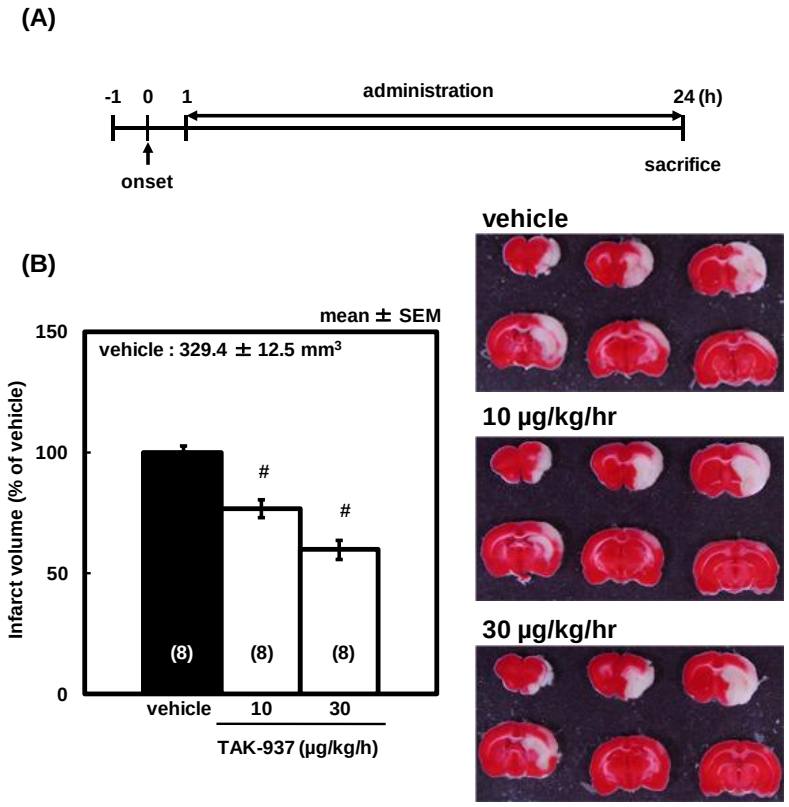


Fig. 9. Effect of TAK-937 on infarct volume in rats with thrombotic MCAO

Intravenous administration of TAK-937 was started 1 h after MCAO. TAK-937 was administered at 10 and 30 μg/kg/h (A). The effect of TAK-937 on infarct volume was examined 24 h after MCAO (B). The slices were stained with TTC 24 h after MCAO. Values of parentheses are the number of animals. Data are presented as mean ± SEM. #P < 0.025 against the vehicle-treated group by one-tailed Williams test.

3.3.4 t-PA と TAK-937 との併用効果：脳梗塞体積縮小効果

t-PA および TAK-937 の脳梗塞体積の縮小効果を検討した。t-PA (3 mg/kg) は MCAO 処置 1 時間後に静脈内より投与し、TAK-937 は MCAO 処置 1 時間後から 24 時間後まで静脈内より持続投与した (Fig. 10A)。その結果、各群の梗塞体積は vehicle 群の 100 ± 3.8%に対し、t-PA 単独投与群 84.8 ± 5.0%、TAK-937 30 μg/kg/h + t-PA 群 (30 + t-PA 群) 61.6 ± 8.6%および TAK-937 100 μg/kg/h + t-PA 群 (100 + t-PA 群) 46.8 ± 6.4%であった (Fig. 10B)。vehicle 群に対し、t-PA 単独投与群において有意な ($P<0.05$) 梗塞体積の縮小効果が認められ、本モデルにおける t-PA の脳梗塞体積縮小効果の再現性が確認された。また t-PA 単独投与群に対し、30 + t-PA 群および 100 + t-PA 群において用量依存的かつ有意な ($P<0.025$) 脳梗塞体積縮小効果の増強が確認された。

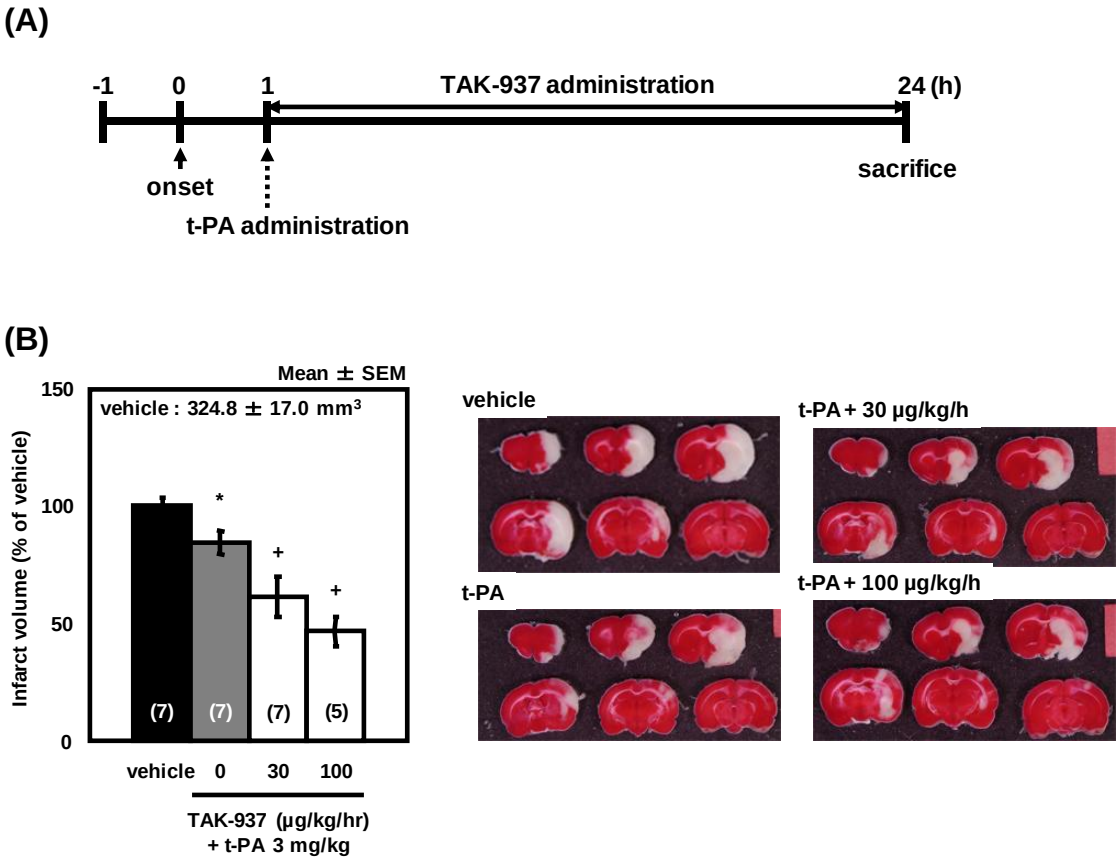


Fig. 10. Effect of combined treatment with t-PA and TAK-937 on infarct volume in young-adult rats with thrombotic MCAO

The both drugs were administered 1 h after MCAO. t-PA was administered intravenously as a bolus injection of 20% of total volume followed by continuous infusion of the remainder over a period of 30 min. The infusion of TAK-937 was terminated 24 h after MCAO. Infarct volume was determined with TTC staining 24 h after MCAO (A). In a combination study, TAK-937 at 30 and 100 μg/kg/h combined with t-PA at 3 mg/kg augmented the effect of reduction of infarct volume, compared with t-PA alone (B). Data are indicated as the mean ± SEM. Statistically significant differences were indicated by a t test (*$P < 0.05$) against a corresponding vehicle-treated group or by a one-tailed Williams test (+$P < 0.025$) against a t-PA-treatment group. The number in parentheses shows the number of rats used.

3.4. 考察

本併用実験を行うにあたり、まず t-PA の用量依存性を確認した。その結果、t-PA の 3 mg/kg および 10 mg/kg は、両用量ともに脳梗塞体積を有意に縮小し、その縮小率は両群間で顕著な差異は認められなかった。したがって、本モデルにおける t-PA の脳梗塞体積縮小効果は 3 mg/kg で十分であると判断し、以下の検討では、3 mg/kg の t-PA を用いた。臨床において t-PA は、欧米では 0.9 mg/kg、日本では 0.6 mg/kg が用いられる (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995, Yamaguchi et al., 2006)。しかしながら、本検討も含め、他の報告でも動物実験においては臨床用量より高い 3 あるいは 10 mg/kg を用いて検討しているものが多い (Zhang et al., 2003, Meng et al., 1999, Maeda et al., 2002)。この理由として、本試験で使用したヒトリコンビナントの t-PA は、ヒトでの活性を 100%とした場合、ラットでは約 10%程度の活性しか示さず、種差が大きいことが報告されている (Korninger and Collen, 1981)。このため臨床用量と動物実験における用量とに乖離が生じたと推察される。

次に、本モデルにおける t-PA の投与タイミングについて検討した。その結果、MCAO 処置 1 時間後より投与を開始した群では、vehicle 群に対して、有意な梗塞体積の縮小が確認された。一方で、虚血 1.5 時間後より投与を開始した群では縮小傾向は見られるものの、有意な縮小は認められず、虚血 2 時間後投与群では、vehicle 群とほぼ同等の梗塞体積を示した。このことから、本モデルにおける t-PA の治療可能時間は 1 時間であることが示唆された (Fig. 8B)。本モデルでの t-PA の血流再開率は約 80％と報告されており (Matsuno et al., 1991)、本試験でも血流再開による脳保護効果であることが示唆される。一方、本モデルにおいて、TAK-937 は閉塞 1 時間後からの投与により有意かつ用量依存的な梗塞体積を示した。また第 2 章に示すとおり、TAK-937 は p-MCAO、即ち血流が再開しない条件においても閉塞 1 時間後からの投与で用量依存的かつ有意な脳保護効果を示すことを明らかとしている。以上から、TAK-937 は t-PA による血流再開とは明らかに異なる作用により脳梗塞を縮小することが示唆される。

次に TAK-937 と t-PA の併用条件に対する影響を検討した。なお TAK-937 の用量は TAK-937 の用量依存性 (Fig.9B) および第 2 章に示す p-MCAO モデルにおける用量依存性の (Fig.4B および 5B-D) 結果から、確実に TAK-937 の薬効が確認できると判断された 30 および 100 μg/kg/h に設定した。その結果、t-PA および TAK-937 併用投与群は、t-PA 単独投与群に対し、有意な脳梗塞体積の縮小効果を示した。TAK-937 が t-PA と併用することで相加・相乗効果を示すかどうかを明らかにするためには、TAK-937 単独投与と併用投与との直接的な比較実験が必要であるが、本試験結果から少なくとも TAK-937 と t-PA の併用は、t-PA 単独投与よりも強い脳保護効果を発揮することが示唆された。これより、t-PA のみでは治療に至らなかった梗塞領域を TAK-937 が救済することができる可能性が推察される。また一般に、再灌流後にはサイトカインなどの産生が亢進するため、脳梗塞病態に悪影響を及ぼすことが知られている。これに対し、TAK-937 は再灌流後のサイトカン産生を抑制することで、再灌流障害を軽減する可能性が推察される。したがって、第 4 章では、TAK-937 のメカニズム解析の一環として機械的な中大脳動脈閉塞再灌流モデルを用いた脳保護効果およびサイトカイン産生に対する作用を検討した。

第 4 章 炎症性サイトカインに対する TAK-937 の作用

4.1. 序文

脳梗塞の分子メカニズムは、単に血流の遮断に伴うエネルギーの枯渇のみで説明されるものではなく、グルタミン酸等の興奮性神経伝達物質の過剰な遊離 (Budd et al., 1998, Mori et al., 2004)、スーパーオキシド等の活性酸素種による酸化ストレス (Chan et al., 2001) および炎症反応 (Liu et al., 1994, Yamagami et al., 1999) などの関与が知られている。中でも炎症反応は、脳梗塞発症早期から数日間にわたって認められ、脳梗塞の拡大と神経症状の悪化に関与すると考えられている。その炎症反応において中心的な役割を果たしているのが炎症性サイトカインであり、ラット脳梗塞モデルおよび脳梗塞患者おいて、IL-1β、 TNF-α および IL-6 などの炎症性サイトカインは、脳梗塞発症早期から産生される。その産生量は、脳梗塞発症後の約 6 時間後にはピークに達し、その後数日から 1 週間まで高いレベルを維持することが報告されている (Nilupul et al., 2006)。また中大脳動脈を閉塞したラットに IL-1β や TNF-α を脳室内に投与すると脳梗塞が増大すること、逆に中和抗体を投与することで、脳障害を抑制することが報告されている (Barone et al., 1997, Yamasaki et al., 1995)。さらに血液中の IL-6 産生量と脳梗塞の障害が相関することが報告されている (Beamer et al., 1995, Vila et al., 2000)。以上から、炎症性サイトカンが主な役割を果たす脳内炎症は脳梗塞の病態に密接に関与し、この炎症性サイトカインの産生を制御し、炎症反応を抑制することは脳梗塞の治療手段として重要であると考えられる。

また第 3 章において TAK-937 は t-PA と併用することにより、t-PA 単独投与に対して、有意な脳保護効果を示した。一般に閉塞血管が再開通されると、再灌流障害が惹起されることが知られており、再灌流障害は炎症性サイトカインなどの産生亢進が原因の一つと考えられている。したがって、TAK-937 と t-PA と

の併用による脳保護効果には TAK-937 が炎症性サイトカインの産生を抑制することにより発揮される可能性が推察される。

栓子を用いた中大脳動脈閉塞再灌流モデルは、頸部の動脈より栓子を挿入し、MCA を閉塞するモデルである。本モデルは、侵襲が少なく、外科的手術による障害が最小限に抑えられるため、外科的処置による炎症反応も最小限に抑えられる。さらに栓子を取り除くことにより、閉塞の一定時間後に確実に再灌流させることができる。これより、本章での炎症性サイトカインに対する作用を検討するうえで、適したモデルである。

したがって、4 章では本モデルを用いて再灌流障害に対する TAK-937 の脳保護効果および炎症性サイトカイン産生に対する TAK-937 の作用について検討した。

4.2. 方法

4.2.1 実験動物および飼育環境

上述 3.2.1 項に準じて行った。

4.2.2 薬物投与用カニューレの留置および薬液調製方法

薬物投与用カニューレの留置、TAK-937 の調製および投与は、上述 2.2.2 項に準じて行い、投与は再灌流直後より開始した。また、対照群には 5% HPBCD を薬物投与群と同条件で投与した。AM251 は、15 mg/mL となるように 0.5%メチルセルロース (和光純薬工業株式会社) を用いて懸濁した。この懸濁液を再灌流 30 分前 (MCAO 処置 90 分後) に 30 mg/kg で腹腔内投与し、対照群には 0.5% MC を AM251 投与群と同条件で投与した。

4.2.3 栓子法による中大脳動脈閉塞・再灌流モデルの作製

中大脳動脈閉塞･再灌流モデルは Zea Longa らの方法を一部改変して作製した (Longa et al, 1989)。ハロセン麻酔下でラットの正中線に沿って頸部を切開し、右総頸動脈を露出させた。続いて外頸動脈および後頭動脈を露出させた。右総頸動脈の血流を動脈クレンメで一時的に止め、外頸動脈と後頭動脈をそれぞれ縫合糸で二重結紮して切断した。その後、外頸動脈を切開し、同部より内頸動脈を経由してシリコンコートしたナイロン栓子を挿入し、その先端を MCA 起始部に留置することで MCA を閉塞した。このとき右総頸動脈を閉塞している動脈クレンメは、そのまま保持した。MCAO 処置 2 時間後に、再びハロセン麻酔下において挿入した栓子および総頸動脈に保持した動脈クレンメを取り除くことで再灌流した。なお、実験中に死亡した個体や栓子挿入により血管穿孔を来たしくも膜下出血を呈した個体は解析の対象より除外した。

4.2.4 直腸温の測定

直腸温の測定は、MCA 閉塞前、再灌流直前、MCAO 閉塞 5、7 および 24 時間後において、physitemp (ニューロサイエンス) を用いて測定した。

4.2.5 脳梗塞体積の測定

上述 2.2.6 項に準じて、MCAO 処置 24 時間後に脳を摘出し、脳梗塞体積の評価を行った。

4.2.6 脳組織サンプルの調製

脳組織中の IL-1β および TNF-α 含量の経時的変化においては MCAO 処置 4、6 および 10 時間後に、その他の検討においては MCAO 処置 10 時間後にラットを

屠殺し、脳を摘出した。脳を摘出後、ブレインスライサーを用いて氷冷下で前脳先端より終脳側へ 4 mm の位置から厚さ 6 mm の切片を作製した。切片は、氷冷下にて健常側と虚血側に分け、それぞれの湿重量を測定した。湿重量の 4 倍量の Calibrator Diluent (R&D system 社) を添加し、脳組織をホモジナイズした。脳ホモジネートは、10,000 g x 20 min (4°C)で遠心し、上清をサンプルとして回収、測定まで-80°C で保存した。回収したサンプル中の IL-1β、TNF-α および IL-6 は、ELISA kit (Quantikine®: R&D system 社) を用いて、定法に従い定量した。

4.2.7 統計解析

測定値は、平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で示した。有意差検定は、以下のとおりに行った。

TAK-937 の脳保護作用に対する AM251 による拮抗実験においては、対照群に対する TAK-937 投与群、AM251 投与群および TAK-937 + AM251 併用投与群の有意差検定は、Aspin-Welch 検定を用い、有意基準は危険率が 5%以下 (P<0.05) とした。TAK-937 投与群に対する、AM251 投与群および TAK-937 + AM251 併用投与群の有意差検定は、Student’s t-test を用い、有意基準は危険率が 5%以下 (P<0.05) とした。

TAK-937 の炎症性サイトカイン産生の抑制作用の用量依存性について、対照群における健常側脳に対する虚血側脳の IL-1β および IL-6 の含量の有意差検定は、Aspin-Welch 検定を用い、有意基準は危険率が 5%以下 (P<0.05) とした。同条件での TNF-α については健常側脳における含量が検出限界以下であったため、統計解析は行わなかった。また虚血側脳の対照群と TAK-937 投与群間の差について、IL-1β および IL-6 は片側パラメトリック Williams 検定を、TNF-α については片側 Shirley-Williams 検定を用いて有意差検定を行った。有意基準は危険率が 2.5%以下 (P<0.025) とした。

TAK-937 の炎症性サイトカイン産生抑制作用に対する AM251 による拮抗実験において、対照群に対する TAK-937 投与群、AM251 投与群および TAK-937+AM251 投与群の有意差検定は、IL-1β については Student’s t 検定を、

TNF-α については Aspin-Welch 検定を用いて行い、有意基準は危険率が 5%以下 (P<0.05) とした。TAK-937 投与群に対する、TAK-937+AM251 投与群の有意差検定は、IL-1β については Student's t 検定を、TNF-α については Aspin-Welch 検定を用いて行い、有意基準は危険率が 5%以下 (P<0.05) とした。すべての統計解析は SAS 前臨床パッケージ version 5.0 (SAS institute, Japan) を用いて実施した。

4.3. 結果

4.3.1 CB1 受容体拮抗薬 AM251 による TAK-937 の脳保護効果の阻害作用

はじめに中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける TAK-937 の薬効および TAK-937 の薬効に対する CB1 受容体の関与を検討した。TAK-937 (100 μg/kg/h) は、MCAO 処置 2 時間後の再灌流直後に投与を開始し、MCAO 処置 24 時間後まで持続投与した。AM251 (30 mg/kg) は MCAO 処置 1.5 時間後に腹腔内投与した (Fig. 11A)。その結果、直腸温は MCAO 処置 7 時間後 (投与 5 時間後) にもっとも低下し、その時点での各群における直腸温はそれぞれ、38.4 ± 0.1°C (vehicle 群)、33.9 ± 0.4°C (TAK-937 投与群)、38.7 ± 0.1°C (AM251 投与群) および 38.5 ± 0.2°C (TAK937+AM251 併用投与群) であった (Fig. 11B)。これより、TAK-937 は中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいても体温低下を示し、この低下は AM251 により拮抗された。

各群の梗塞体積は vehicle 群 の 100.0 ± 11.2% に対して、それぞれ、25.4 ± 7.2% (TAK-937 投与群)、117.2 ± 10.7% (AM251 投与群) および 97.5 ± 12.1% (TAK937+AM251 併用投与群) であった (Fig. 11C)。本モデルにおいて TAK-937 は脳梗塞体積を有意に (P<0.05) 抑制し、その作用は AM251 によって有意に (P<0.05) 拮抗された。

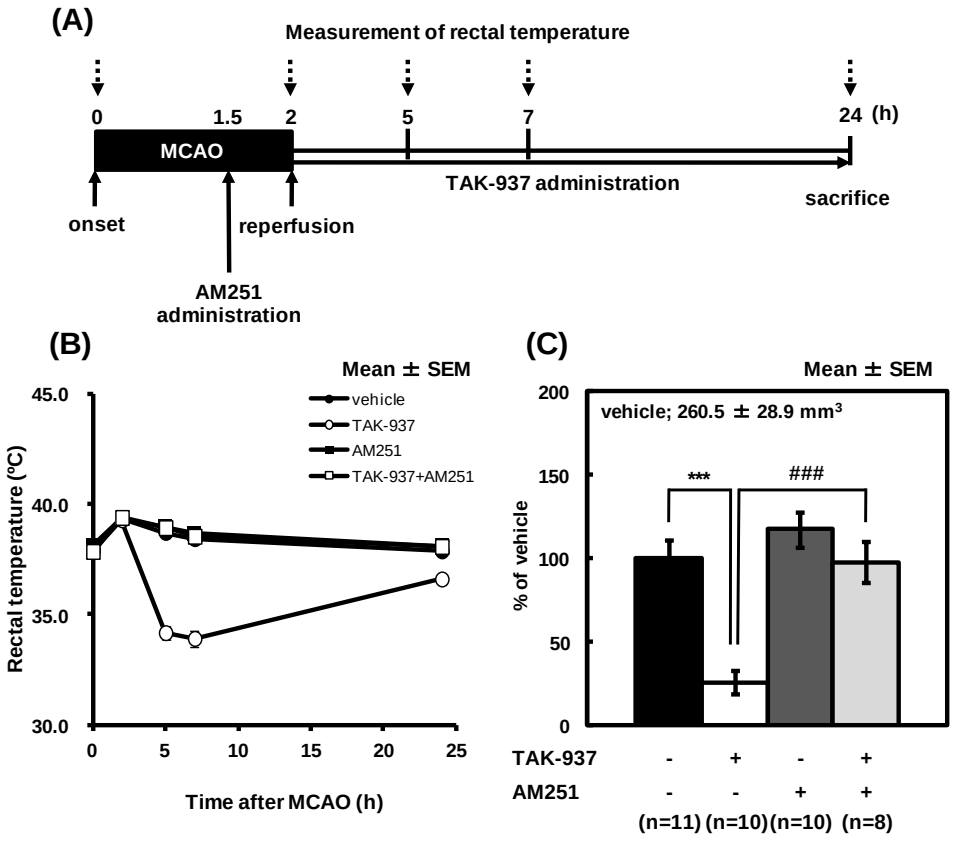


Fig. 11. Reversal of protection of TAK-937 by AM251, a CB1 antagonist, after transient MCAO in rats.

Infusion of TAK-937 (100 μg/kg/h) or vehicle was started just after the reperfusion. AM251 (30 mg/kg) or vehicle was intraperitoneally injected 30 min before the reperfusion. Brains were isolated after 2 h-MCAO and 22 h-reperfusion (A). AM251 fully reversed the hypothermic (B) and protective (C) effect of TAK-937. Data are indicated as the mean ± SEM. Significant differences from vehicle-treated group is indicated by ***P < 0.001 (Aspin-Welch test) and significant difference from TAK-937-treated group is indicated by ###P < 0.001 (Student's t-test). The number in parentheses shows the number of rats adopted.

4.3.2 中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける炎症性サイトカイン産生量の時間依存性

虚血後の炎症性サイトカインの産生量変化を検討する目的で、MCAO 処置 4、6 および 10 時間後における脳内の IL-1β および TNF-α を測定した (Fig. 12A)。IL-1β について、健常側での MCAO 処置 4、6 および 10 時間後の産生量はそれぞれ、206.8 ± 24.7、248.1 ± 93.8 および 221.0 ± 27.8 pg/g tissue であり、いずれの時点においても産生量に変化はなかった。一方、MCAO 処置 4、6 および 10 時間後における虚血側での脳内 IL-1β 産生量はそれぞれ、774.7 ± 115.2、810.2 ± 38.6 および 2678.5 ± 78.0 pg/g tissue であった (Fig. 12B)。

TNF-α について、健常側での産生量はいずれの時点においても検出限界以下であった。一方、虚血側での虚血 4、6 および 10 時間後の産生量はそれぞれ、78.9 ± 46.7、77.5 ± 42.4 および 260.0 ± 140.7 pg/g tissue であった (Fig. 12C)。

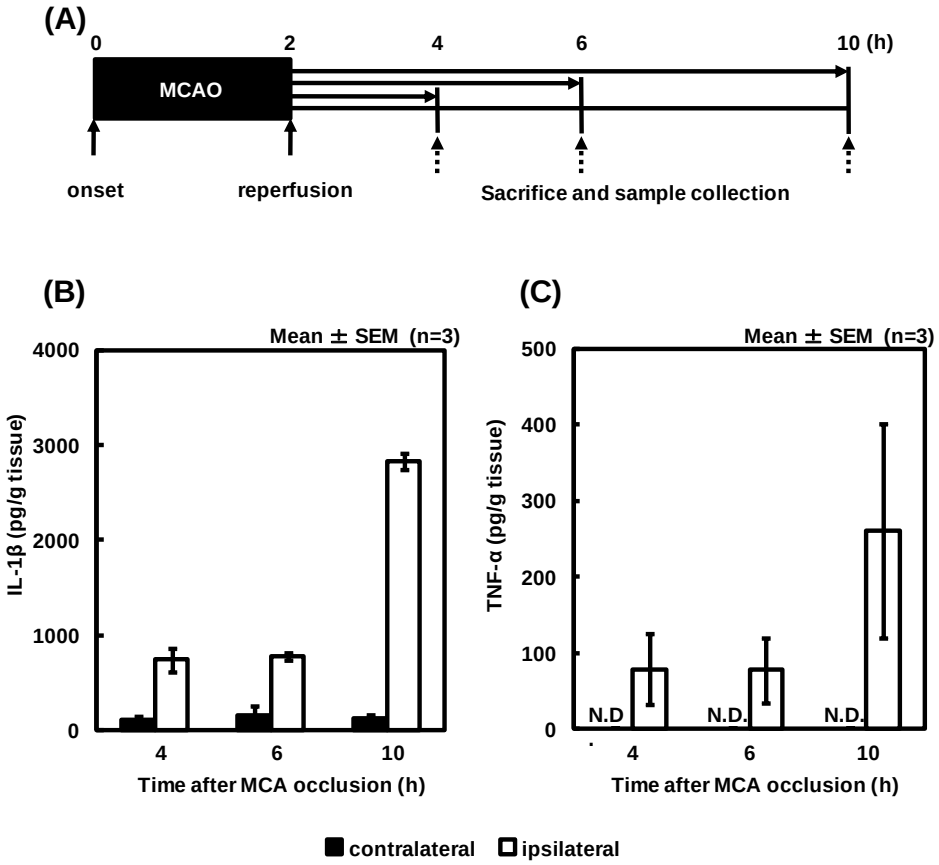


Fig. 12. Time-dependent change of IL-1β and TNF-α protein levels in transient MCAO model in rats.

Brain samples were obtained 4, 6 and 10 h after transient MCAO in rats (A). The content of IL-1β and TNF-α in brain tissue was determined with ELISA kit. IL-1β (B) and TNF-α (C) protein levels were remarkably increased 10 h after MCAO. Data indicated as the mean ± SEM. n=3

4.3.3 中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける TAK-937 による炎症性サイトカインの産生抑制作用

MCAO 処置 10 時間後において脳を摘出し、脳内の IL-1β、TNF-α および IL-6 産生量に対する TAK-937 の作用を検討した (Fig. 13A)。健常側での IL-1β 産生量は、vehicle 投与群および TAK-937 (30 および 100 μg/kg/h) 投与群においてそれ

ぞれ、303.6 ± 42.9、181.4 ± 10.9 および 151.8 ± 27.3 pg/g tissue であった。一方、虚血側における IL-1β 産生量は、vehicle 投与群および TAK-937 (30 および 100 μg/kg/h) 投与群において、それぞれ 2245.3 ± 409.9、1590.7 ± 301.7 および 1022.6 ± 133.4 pg/g tissue であった (Fig. 13B)。

健常側において TNF-α 産生量は、いずれの群においても検出限界以下であった。一方虚血側における TNF-α 産生量は、vehicle 投与群および TAK-937 (30 および 100 μg/kg/h) 投与群においてそれぞれ、224.6 ± 86.1、86.9 ± 29.4 および 34.1 ± 22.8 pg/g tissue であった (Fig. 13C)。

健常側における IL-6 産生量は、vehicle 投与群および TAK-937 (30 および 100 μg/kg/h) 投与群においてそれぞれ 151.6 ± 6.9、96.6 ± 3.7 および 101.8 ± 2.9 pg/g tissue であった。一方虚血側における IL-6 産生量は、vehicle 投与群および TAK-937 (30 および 100 μg/kg/h) 投与群においてそれぞれ、548.3 ± 98.7、278.6 ± 64.0 および 191.4 ± 34.0 pg/g tissue であった (Fig. 13D)。

MCAO 処置により IL-1β、TNF-α および IL-6 の産生が増加し、TAK-937 はこれらの産生増加を有意 ($P<0.025$) かつ用量依存的に抑制した。

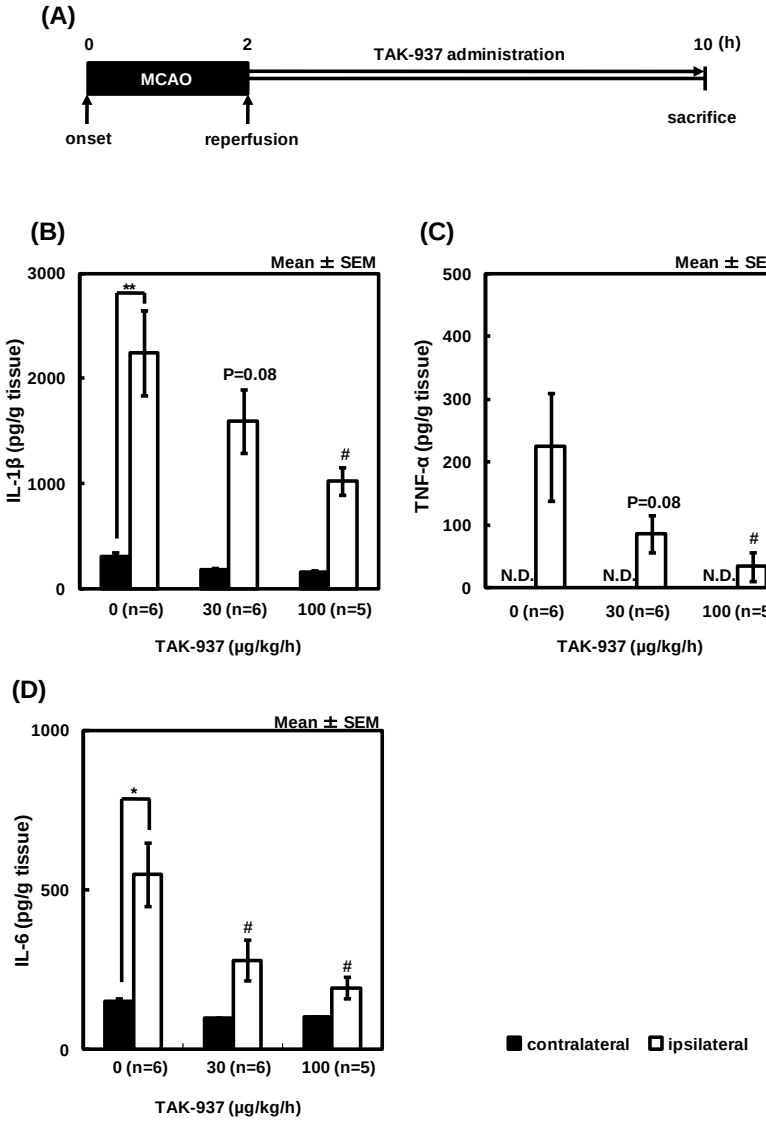


Fig. 13. Effect of TAK-937 on cytokine production after transient MCAO in rats

Intravenous administration of TAK-937 at 30 or 100 μg/kg/h, or vehicle was started immediately after reperfusion and continued till 8 h after reperfusion (A). The content of IL-1β, TNF-α and IL-6 in brain tissue was determined with ELISA kit. TAK-937 reduced the content of IL-1β (B), TNF-α (C) and IL-6 (D) in brain tissue. Values of parentheses are the number of animals. Data are represented as mean ± SEM. *P < 0.05, **P < 0.01 ipsilateral vs. contralateral in vehicle-treated group by Aspin-Welch test. #P < 0.025 against ipsilateral in vehicle-treated group by one-tailed parametric Williams test (IL-1β and IL-6) and one-tailed Shirley-Williams test (TNF-α). N.D.: not detectable-

4.3.4 TAK-937 による炎症性サイトカインの産生抑制作用における CB1 受容体の関与

TAK-937 の炎症性サイトカイン産生抑制作用が CB1 受容体を介しているかを調べるために、CB1 受容体の選択的拮抗薬である AM251 を用いて検討した。Fig. 14A に示すタイムスケジュールにて各化合物の投与、体温測定および脳の摘出を行った。

健常側における IL-1β 産生量は、vehicle 群、TAK-937 投与群、AM251 投与群および TAK-937 + AM251 投与群においてそれぞれ、326.1 ± 37.1、106.2 ± 27.9、357.6 ± 74.8 および 460.0 ± 118.3 pg/g tissue であり、虚血側での産生量はそれぞれ、2017.4 ± 172.3、1271.9 ± 217.3、1850.4 ± 183.0 および 2196.5 ± 240.0 pg/g tissue であった (Fig. 14B)。

また TNF-α について、健常側における産生量は、いずれの群でも検出限界以下であったが、虚血側での産生量はそれぞれ、334.9 ± 71.9、104.9 ± 27.7、207.3 ± 50.3 および 378.1 ± 73.5 pg/g tissue であった (Fig. 14C)。

4.3.3 の結果と同様に TAK-937 は IL-1β および TNF-α の産生増加を有意に ($P<0.05$) 抑制した。またこの抑制作用は AM251 により有意に ($P<0.05$) 拮抗された。

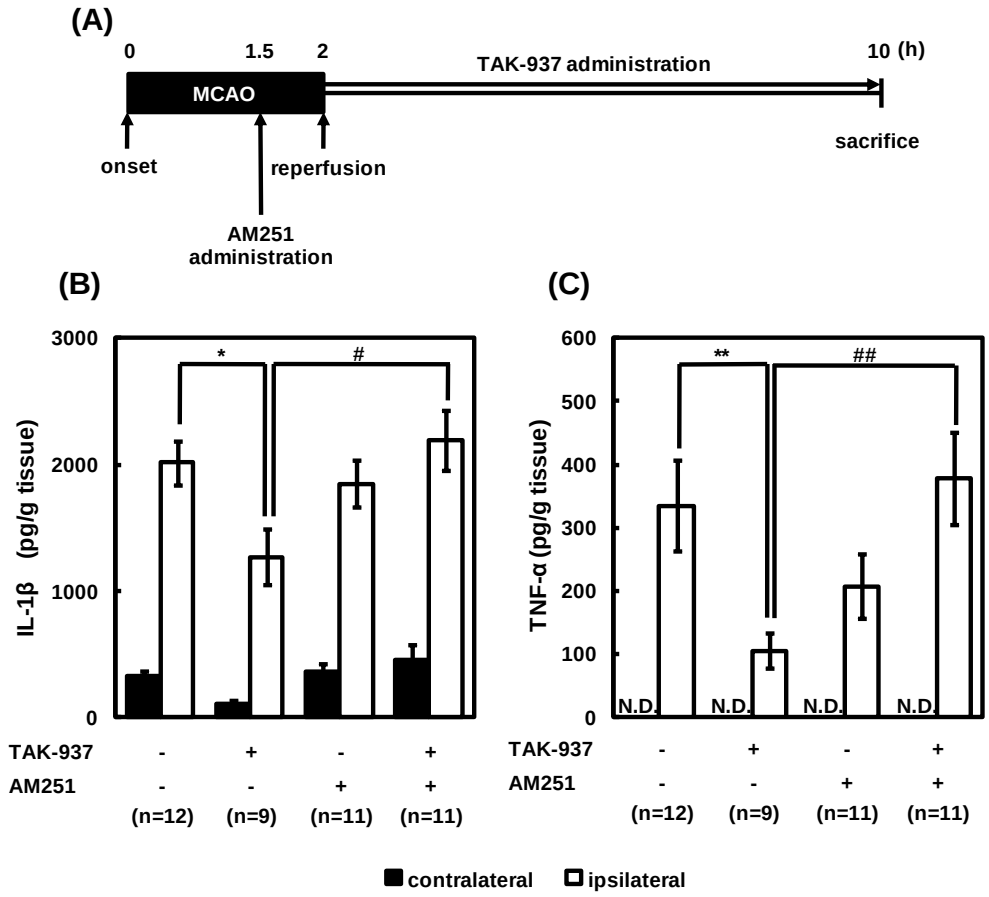


Fig. 14. Effect of AM251, a CB1 receptor antagonist, on the inhibitory effects of TAK-937 on cytokine production in rats subjected to transient MCAO

TAK-937 (100 μg/kg/h) was infused intravenously for 8 h immediately after reperfusion and AM251 (30 mg/kg) was administered intraperitoneally 30 minute before reperfusion (A). The content of IL-1β and TNF-α was determined with ELISA kit. TAK-937 reduced the production of IL-1β (B) and TNF-α (C) and the reducing effect of TAK-937 on IL-1β and TNF-α was reversed by AM251. Values of parentheses are the number of animals. Data are represented as mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vehicle-treated group vs. TAK-937-treated group by Student's t-test (IL-1β) or Aspin-Welch test (TNF-α). #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 TAK-937-treated group vs. combined treatment of TAK-937 and AM251 by Student's t-test (IL-1β) or Aspin-Welch test (TNF-α). N.D.: not detectable

4.4. 考察

p-MCAO モデルと同様に、TAK-937 はラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいて有意な脳梗塞体積の縮小効果を示した。また本試験において、TAK-937 による脳梗塞体積の縮小効果は、CB1 受容体拮抗薬である AM251 により完全に拮抗された。AM251 は (CB1 受容体に対する Ki 値 ; 7.49 nM, CB2 受容体に対する Ki 値 ; 2290 nM) CB1 受容体に対する親和性が CB2 受容体に対するものより約 300 倍高いと報告されている (Lan et al., 1999)。したがって、今回の実験条件における TAK-937 の脳保護効果は、主に CB1 受容体を介していることが示唆された。一方で AM251 単独投与群では、vehicle 群に対して、20%程度脳梗塞が増悪する傾向が認められた。CB1 ノックアウトマウスにおいて脳梗塞が増悪するという報告 (Parmentier et al., 2002) とあわせて考えると、おそらく代償的に増加する内在性の CB が保護的な作用を発揮していると推察される。

本試験に用いた塞栓子による中大脳動脈再灌流モデルにおいて、炎症性サイトカンの産生は MCAO 処置 4 時間後において、健常側と比較して、虚血側ではすでに増加が認められ、MCAO 処置 10 時間後においてさらに増加した。本試験と同様に脳梗塞急性期の患者において、IL-1β、TNF-α および IL-6 は発症約 4 時間後から産生が増加し、発症 24 時間以内にピークを迎えることが報告されている (Nilupul et al., 2006)。これより、炎症性サイトカインの産生は脳障害に先行して誘導され、脳梗塞の障害の原因の一つである可能性が高いことが推察される。

本試験において TAK-937 はこれら炎症性サイトカインの産生を用量依存的に有意に抑制し、またこの作用は AM251 により拮抗された。したがって、TAK-937 は CB1 受容体を介して炎症性サイトカインの産生を抑制することが示唆された。TAK-937 の炎症サイトカインの産生抑制作用および脳保護効果がいずれも CB1 受容体を介して発揮されることから、TAK-937 の炎症性サイトカインの産生抑制作用が脳保護効果の一端に寄与している可能性が示唆される。また t-PA による直接的な細胞障害および t-PA による再灌流障害にはこれら炎症性サイトカンの関与が示唆されている (Miyazaki et al., 2011, Yepes et al., 2008)。これより、第 3

章で示した t-PA と TAK-937 の併用投与による上乗せ効果には TAK-937 による炎症性サイトカインの産生抑制効果が関与する可能性が推察される。

一方で、末梢性の免疫細胞に発現する CB2 受容体は、免疫細胞において炎症反応に関与するという報告がある (Galiegue et al., 1995, Munro et al., 1993)。この受容体はアストロサイトやミクログリアにも発現が確認されており (Fernández et al., 2007)、活性化したミクログリアやアストロサイトに対して抗炎症作用を示すと考えられている。しかしながら本試験において、TAK-937 による作用は AM251 による完全に拮抗されたことから、脳梗塞急性期における TAK-937 の作用に CB2 受容体が関与する可能性は低いことが示唆される。また既報において (Liu et al., 1994, Wang et al., 1994)、免疫組織化学的手法により、脳梗塞初期において TNF-α がアストロサイトではなく、神経線維に発現することが示唆されている。さらに脳梗塞の病態において、グリオーシスが認められるのは虚血 2〜3 日後であり (Mori et al., 2008)、アストロサイトやミクログリアは脳梗塞の亜急性期あるいは慢性期に見られる脳内炎症への関与は大きいものの、急性期での関与は低い可能性が推察される。これより、これら炎症性サイトカインが免疫細胞やミクログリアの活性化を誘導するトリガーとなる可能性が推察された。したがって、本試験で確認された炎症性サイトカインは、アストロサイトやミクログリアではなく、CB2 受容体の発現していない神経細胞から産生され、TAK-937 によるこれら炎症性サイトカインの産生抑制作用は CB1 受容体を介した反応であることが強く示唆される。

既報において我々は、TAK-937 は低体温作用を示すこと、およびこの低体温作用が脳保護作用の一端を担っていることが明らかにした (Suzuki et al., 2012b)。本試験で認められた炎症性サイトカインの産生抑制作用に低体温作用がどれほど寄与するかは明らかとなっておらず、これは今後の課題であるが、脳梗塞において低体温が脳保護効果を示すこと (Bernard et al., 2002, Shankaran et al., 2005, The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group, 2002)、およびこの脳保護効果には TNF-α の産生抑制が関与すること (Han et al., 2003) が報告されている。これより、本試験で認められた炎症性サイトカイン産生抑制作用には低体温作用が寄与する可能性が推察される。しかしながら、TAK-937 の低体温作用が脳保護

効果に一部寄与するものの、復温しても一部保護効果が認められること (Suzuki et al., 2012b) から、TAK-937 が直接的に炎症性サイトカインの産生を抑制する可能性も有することが推察される。

以上から、TAK-937 は虚血発症早期から認められる炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。またこの作用は CB1 受容体を介しており、TAK-937 の脳保護作用のメカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。

第 5 章 おわりに

本研究結果より、CB 受容体作動薬は p-MCAO モデルおよび中大脳動脈閉塞再灌流モデルいずれにおいても強力な脳保護作用を示すこと、さらに CB 受容体作動薬は老齢動物においても有効であることが明らかとなった。また CB 受容体作動薬は p-MCAO モデルにおいて脳梗塞発症後 5 時間という広い治療可能時間を有することが示唆された。さらに CB 受容体作動薬は t-PA との併用投与において、t-PA 単独投与と比較して、強い脳保護効果を発揮し、t-PA で救済し切れない脳障害部位を救済しうることが示唆された。これより CB 受容体作動薬は、緒言で示した(1) t-PA が適応できず、再開通が達成されなかった脳梗塞患者に適応される場合、(2) t-PA が適応される脳梗塞患者に併用される場合、および(3) t-PA あるいは血行再建療法により血流が再開された脳梗塞患者に適応される場合のいずれの場合においても適応可能であることが期待される。さらに、この CB 受容体作動薬の脳保護効果は、CB1 受容体を介して発揮されることが示唆され、その作用メカニズムの一部には炎症性サイトカインの産生抑制作用が関与することが示唆された。これより、CB 受容体作動薬は t-PA による再灌流障害を抑制する可能性が推察される。

脳梗塞は、生活習慣の改善や生活習慣病の薬剤の適用から死亡原因の疾患としての順位こそ第 4 位に下がったものの、発症すると十分な予後機能の改善が見込めず、QOL を著しく損なう疾患である。また本疾患は加齢にともない増加し、超高齢化社会への移行とともに増加の一途をたどることが予想される。今回の研究により明らかにされた強力な脳保護作用を有する本薬剤が、臨床の脳梗塞急性期において有効性を示すことが期待される。

第 6 章 結語

1, CB 受容体作動薬は、p-MCAO モデルにおいて用量依存的な脳保護効果を示す。

2, CB 受容体作動薬は、p-MCAO モデルにおいて 5 時間の治療可能時間を有する。

3, CB 受容体作動薬は、若齢動物のみならず、老齢動物においても虚血性脳障害を保護しうる。

4, CB 受容体作動薬は、t-PA と併用することで t-PA 単独よりも強い脳保護作用を発揮し、t-PA のみでは救済するに至らなかった脳障害部位を救済することが期待される。

5, CB 受容体作動薬は、中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいても脳保護効果を示す。

6, CB 受容体作動薬の脳保護作用は、脳梗塞発症初期において CB1 受容体を介して発揮される。

7, CB 受容体作動薬による脳保護効果の作用メカニズムの一部には、炎症性サイトカインの産生抑制作用が関与する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行するうえにおいて終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、金沢大学大学院医薬保健学総合研究科薬物学研究室の米田幸雄教授および檜井栄一准教授、金沢大学大学院医薬保健学総合研究科分子薬物治療学研究室の中道範隆助教に厚く御礼申し上げます。

また本研究を進めるにあたり、厳格なる御指導と御助言を頂きました武田薬品工業株式会社の中枢疾患創薬ユニットの平井圭介副ユニット長、下条雅人主席部員、鈴木基久主任研究員、鈴木敬子主任研究員および濱條和弘主任研究員、炎症疾患創薬ユニットの塚本徹也主席研究員に深く感謝いたします。

引用文献

Adams HP Jr, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, Grubb RL, Higashida RT, Jauch EC, Kidwell C, Lyden PD, Morgenstern LB, Qureshi AI, Rosenwasser RH, Scott PA, Wijdicks EF. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. Stroke 38:1655-1711 (2007)

Adeoye O, Jauch EC. Management of arterial hypertension in patients with acute stroke. Curr Treat Options Neurol. 8:477-485. (2006)

Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. Stroke 12:723-725 (1981)

Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG,

Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-: a mediator of focal ischemic brain injury. Stroke 28:1233–1244. (1997)

Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. Ann Neurol. 37:800–805. (1995)

Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. N Engl J Med. 346:557-563. (2002)

Budd SL. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. Pharmacol Ther. 80:203-229. (1998)

Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab. 21:2-14. (2001)

Clark WM, Raps EC, Tong DC, Kelly RE. Cervene (Nalmefene) in acute ischemic stroke: final results of a phase III effi- cacy study. The Cervene Stroke Study Investigators. Stroke 31:1234-1239. (2000)

Davis SM, Lees KR, Albers GW, Diener HC, Markabi S, Karlsson G, Norris J. Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. Stroke 31:347-354 (2000)

Denti L, Scoditti U, Tonelli C, Saccavini M, Caminiti C, Valcavi R, Benatti M, Ceda GP. The poor outcome of ischemic stroke in very old people: a cohort study of its determinants. J Am Geriatr Soc 58:12–17. (2010)

Diener HC, Cortens M, Ford G, Grotta J, Hacke W, Kaste M, Koudstaal PJ, Wessel T. Lubeluzole in acute ischemic stroke treatment. A double-blind study with an 8-hour inclusion window comparing a 10-mg daily dose of lubeluzole with placebo. Stroke 31:2543-2551 (2000)

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci. 22:391-397. (1999)

Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? Trends Pharmacol Sci. 28:39-45. (2007)

Fox G, Gallacher D, Shevde S, Loftus J, Swayne G. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. Stroke 24:2087-2092. (1993)

Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. Eur. J. Biochem. 232:54-61 (1995)

Gaoini Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. J. Am. Chem. Soc. 86:1646-1647. (1964)

Gelmers HJ, Hennerici M. Effects of nimodipine on acute ischemic stroke. Pooled results from five randomized trials. Stroke 21 (Suppl):IV81-84 (1990)

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 127:e6–e245. (2013)

Grundy RI. The therapeutic potential of the cannabinoids in neuroprotection. Expert Opin. Investig. Drugs 11:1365-74 (2002)

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. N Engl J Med. 359:1317-1329 (2008)

Han HS, Karabiyikoglu M, Kelly S, Sobel RA, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 23:589-598. (2003)

He Z, Ibayashi S, Sugimori H, Fujii K, Sadoshima S, Fujishima M. Age-related

ischemia in the brain following bilateral carotid artery occlusion--collateral blood flow and brain metabolism. Neurochem. Res. 22:37-42. (1997)

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Cannabinoid receptor localization in brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:1932-1936. (1990)

Horn J, Limburg M. Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review. Stroke 32:570-576. (2001)

Iribarne M, Torbidoni V, Julián K, Prestifilippo JP, Sinha D, Rettori V, Berra A, Suburo AM. Cannabinoid receptors in conjunctival epithelium: identification and functional properties. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49:4535-4544. (2008)

Kamiya T, Jacewicz M, Nowak TS Jr, et al. Cerebral blood flow thresholds for mRNA synthesis after focal ischemia and the effect of MK-801. Stroke 36:2463-2467. (2005)

Korninger C, Collen D. Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro. Thromb. Haemost. 46:561-565. (1981)

Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. J Med Chem. 42:769-776. (1999)

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosisfactor-alpha expression in ischemic neurons. Stroke. 25:1481-1488. (1994)

Lyden P, Shuaib A, Ng K, Levin K, Atkinson RP, Rajput A, Wechsler L, Ashwood T, Claesson L, Odergren T, Salazar-Grueso E; CLASS-I/H/T Investigators. Clomethiazole acute stroke study in ischemic stroke (CLASS-I): final results. Stroke 33:122-128. (2002)

Maeda M, Furuichi Y, Ueyama N, Moriguchi A, Satoh N, Matsuoka N. A combined treatment with tacrolimus (FK506) and recombinant tissue plasminogen activator for thrombotic focal cerebral ischemia in rats: increased neuroprotective efficacy

and extended therapeutic time window. J. Cereb. Blood Flow Metab. 22:1205–1211. (2002)

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346:561-564. (1990)

Matsuno H, Uematsu T, Nagashima S, Nakashima M. Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. J Pharmacol Methods 25:303-317. (1991)

Matsuno H, Uematsu T, Umemura K, Takiguchi Y, Asai Y, Muranaka Y, Nakashima M. A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rats induced by a photochemical reaction and the effect of a plasminogen-plasminogen activator chimera in this model. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 29:165-173. (1993)

Meng W, Wang X, Asahi M, Kano T, Asahi K, Ackerman RH, Lo EH. Effects of tissue type plasminogen activator in embolic versus mechanical models of focal cerebral ischemia in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. 19:1316-1321. (1999)

Miyazaki T, Kimura Y, Ohata H, Hashimoto T, Shibata K, Hasumi K, Honda K. Distinct effects of tissue-type plasminogen activator and SMTP-7 on cerebrovascular inflammation following thrombolytic reperfusion. Stroke 42:1097-1104. (2011)

Mori T, Tateishi N, Kagamiishi Y, Shimoda T, Satoh S, Ono S, Katsube N, Asano T. Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506. Neurochem Int. 45:381-387. (2004)

Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. Stroke 39:2114-2121. (2008)

Moskowitz MA. The Adventures of a Translational Researcher in Stroke and Migraine. Stroke 38:1645-1651. (2007)

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral

receptor for cannabinoids. Nature 365:61-65. (1993)

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J. Neurosci. 19:2987-2995. (1999)

Nilupul Perera M, Ma HK, Arakawa S, Howells DW, Markus R, Rowe CC, Donnan GA. Inflammation following stroke. J Clin Neurosci. 13:1-8. (2006)

Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. J Neurosci. 22:9771-9775. (2002)

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Pharmacol. Ther. 74:129-80. (1997)

Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, Kessler C. Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. Acta Neuropathol. 113:277-293. (2007)

Ritter L, Funk J, Schenkel L, Tipton A, Downey K, Wilson J, Coull B, McDonagh P. Inflammatory and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation of aged rats after global cerebral ischemia and reperfusion. Microcirculation. 15:297-310. (2008)

Rubino GJ, Young W. Ischemic cortical lesions after permanent occlusion of individual middle cerebral artery branches in rats. Stroke 19:870-877 (1988)

Saniabadi AR, Umemura K, Matsumoto N, Sakuma S, Nakashima M. Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. Thromb. Haemost. 73:868-72 (1995)

Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole WK, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Duara S, Oh W, Cotten CM, Stevenson DK, Stoll BJ, Lemons JA, Guillet R, Jobe AH. Whole-body-hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. N Engl J Med. 353:1574-1584. (2005)

Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA. Cannabinoid receptor agonists inhibit

glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. J Neurosci. 16:4322-4334. (1996)

Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U; SAINT II Trial Investigators. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. N Engl J Med. 357:562-571. (2007)

Suzuki N, Suzuki M, Murakami K, Hamajo K, Tsukamoto T, Shimojo M. Cerebroprotective effects of TAK-937, a cannabinoid receptor agonist, on ischemic brain damage in middle cerebral artery occluded rats and non-human primates. Brain Res. 1430:93-100. (2012a).

Suzuki N, Suzuki M, Murakami K, Hamajo K, Tsukamoto T, Shimojo M. Contribution of hypothermia and CB1 receptor activation to protective effects of TAK-937, a cannabinoid receptor agonist, in rat transient MCAO model. PLoS One. 7:e40889. doi: 10.1371/journal.pone.0040889. (2012b)

Suzuki Y, Takagi Y, Nakamura R, Hashimoto K, Umemura K. Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemic damage in aged rats. Brain Res. 964:116–120. (2003)

Takamatsu H, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Neuroprotective effects depend on the model of focal ischemia following middle cerebral artery occlusion. Eur J Pharmacol 362:137–142. (1998)

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1:53-60 (1981 a)

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [14C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1:61-69 (1981 b)

Tateishi N, Mori T, Kagamiishi Y, Satoh S, Katsube N, Morikawa E, Morimoto T, Matsui T, Asano T. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part II: Suppression of astrocytic activation by a

novel agent (R)-(-)-2-propyloctanoic asid (ONO-2506) leads to mitigation of delayed infarct expansion and early improvement of neurologic deficits. J Cereb Blood Flow Metab 22:723-734. (2002)

The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurological outcome after cardiac arrest. N Engl J Med. 346:549-556. (2002)

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N. Engl. J. Med. 333:1581–1587. (1995)

Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, Asano T. A New Model of Cerebral Microthrombosis in rats and neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. Stroke 31:2245-2250 (2000)

Treib J, Grauer MT, Woessner R, Morgenthaler M. Treatment of stroke on an intensive stroke unit: a novel concept. Intensive. Care Med. 26:1598-1611. (2000)

Umemura K, Wada K, Uematsu T, Nakashima M. Evaluation of the combination of a tissue-type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A2 receptor antagonist, vapiprost, in a rat middle cerebral artery thrombosis model. Stroke 24:1077-81. (1993)

Umemura K, Toshima Y, Nakashima M. Thrombolytic efficacy of a modified tissue-type plasminogen activator, SUN9216, in the rat middle cerebral artery thrombosis model. Eur. J. Pharmacol. 262:27-31. (1994)

Vila N, Reverter JC, Yague J, Chamorro A. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. J Interferon Cytokine Res. 20:325–329. (2000)

Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Hacke W, Millán M, Muir K, Roine RO, Toni D, Lees KR; SITS investigators. Thrombolysis with alteplase 3 - 4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS - ISTR): an observational study. Lancet 372:1303-1309. (2008)

Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant

cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. Mol Chem Neuropathol. 23:103-114. (1994)

Warlow CP. Epidemiology of stroke. Lancet 352 Suppl 3:1–4. (1998)

Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P. Stroke. Lancet 362:1211-1224. (2003)

Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, Endo N, Tanabe H, Katsuura Y, Komoriya K. Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. J Leukoc Biol. 65:744-749. (1999)

Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, Nakagawara J, Hashi K, Saito I, Shinohara Y; Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT) Group. Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT). Stroke 37:1810-1815. (2006)

Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenic mediator of ischemic brain damage in rats. Stroke 26:676–681. (1995)

Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. Trends Neurosci. 32:48-55. (2009)

Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 20:84-91. (1989)

Zhang L, Zhang ZG, Zhang RL, Lu M, Krams M, Chopp M. Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke. Stroke 34:1790-1795. (2003)

Zhang M, Adler MW, Abood ME, Ganea D, Jallo J, Tuma RF. CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. Microvascular Res 78: 86–94. (2009)